Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

# Isolement, quantification et caractérisation de *Campylobacter* spp. dans le bassin versant de la rivière South Nation sur une période de trois ans (2010-2012)

Par
Natacha Laprade

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.) en microbiologie appliquée

## Jury d'évaluation

| | |
|---|---|
| Président du jury et examinateur interne | Éric Déziel<br>INRS-Institut Armand-Frappier |
| Examinateur externe | Rebecca Guy<br>Agence de la santé publique Canada<br>Saint-Hyacinthe, Québec |
| Directeur de recherche | Richard Villemur<br>INRS-Institut Armand-Frappier |

© droits réservés de Natacha LAPRADE, 2014

# RÉSUMÉ

Les eaux de surface sont contaminées par diverses sources et les pathogènes aquatiques peuvent causés des infections par le biais d'ingestion d'eau contaminée lors de sports nautiques. De plus, les infections peuvent survenir lors de l'ingestion d'eau municipale contaminée par le biais d'un système de traitement des eaux défectueux.

Cette étude se veut une première approche dans la quantification et la caractérisation de *Campylobacter* spp. dans les eaux de surface dans le but de faire la lumière sur certains risques qui pourraient être associés à une infection par un isolat aquatique. Les échantillons d'eau de surface ont été prélevés du bassin de la rivière South Nation. Ce bassin est entouré terres agricoles, de secteurs urbains et de ruraux ce qui en fait un bon réservoir pour ce genre d'étude. Afin d'obtenir les isolats *Campylobacter* aquatiques à partir des échantillons, la méthode du nombre le plus probable a été utilisée, car elle s'avérait la plus efficace lors d'études préliminaires effectué en 2010. Les isolats ont été caractérisés au niveau du genre et de l'espèce pour finalement déterminer que l'espèce dominante dans le bassin de la rivière South Nation est *C. jejuni*. Ce résultat est évidemment tributaire de la méthode de culture utilisée et les amorces PCR utilisées lors des amplifications PCR pour la caractérisation. Cette étude a innovée en utilisant cinq mPCR pour la détection simultanée de huit gènes de virulence, quatre gènes de production de cytotoxines et un gène de résistance à la tétracycline. L'application de ces mPCR a permis de déterminer que les isolats aquatiques avaient un potentiel pathogénique, quoique la fonction de ces gènes soit non-confirmée.

Dans les études futures, il serait intéressant de tenter de déterminer les sources de contamination et les facteurs qui peuvent modifier la concentration de *Campylobacter* dans les eaux de surface ainsi que d'évaluer l'expression des gènes de virulence.

Mots clés : *Campylobacter*, eau de surface, nombre le plus probable, agriculture, gène de virulence, gène de production de cytotoxines, tétracycline et PCR multiplexe.

# ABSTRACT

The surface waters are contaminated by various source and the aquatics pathogens can cause infection when someone ingest that water when practicing water sports. In addition, infection may occur upon ingestion of contaminated city water through a defective treatment water system.

This study is a first step in the quantification and characterization of *Campylobacter* species in the surface water in order to shed light on some of the risks associated with infection by water isolate. The surface water samples were taken from the South Nation River basin. This basin is surrounded by farmland, urban and rural development which makes it an interesting area for this kind of study. To obtain *Campylobacter* aquatics isolates from the aquatic samples, the most probable number was used because it proved to be the most effective method in preliminary studies conducted in 2010. The isolates were characterized to the genus and species level and it was determined that the dominant species was *C. jejuni*. This is obviously dependent on the culture method and the PCR primers used for the characterization. This study was innovative because it used five mPCR for the detection of virulence genes, for cytotoxin production genes and one tetracycline resistance gene. The application of these mPCR has determined that aquatic isolates had a pathogenic potential, although the function of these genes is unconfirmed.

In future studies, it would be interesting to determine the sources of contamination and the factors that can modify the *Campylobacter* concentration in surface waters and to evaluate the expression of the virulence genes.

keywords: *Campylobacter*, surface water, most propable numbre, agriculture, virulence gene, cytotoxin production gene, tetracycline et multiplexe PCR.

# REMERCIEMENT

Je dédie ce mémoire de maîtrise à feu Martin Lanthier (Ph. D.) qui m'a inspiré à poursuivre mes études en sciences dans son laboratoire et qui était si généreux de son temps et de ses connaissances. J'aimerais aussi souligné le support exceptionnel de mon directeur de recherche, Richard Villemur (Ph. D.) qui a su tenir la barre et communiquer des mots d'encouragement dans les moments plus difficiles. Un merci tout spécial à Izhar Khan (Ph. D.) qui s'est engagé corps et âme avec sa nouvelle équipe de laboratoire. Grâce aux trois scientifiques que j'ai eu la chance de côtoyer, je ressors grandi de mon expérience de maîtrise et avec un bagage bien rempli de connaissances en laboratoire de microbiologie environnemental. Mon expérience a été difficile, mais grâce au soutien constant offert par les personnes qui me supervisaient je suis une personne plus forte.

Un grand merci à Michel Cloutier pour son soutien technique offert à maintes reprises. Un énorme merci à Jenni Whiteduck Léveillée et Kerri Whiteduck Léveillée qui ont veillé à m'appuyer moralement. Merci aux nombreux étudiants COOP qui ont offert leur aide et leur temps sans compter.

Je veux également remercier Agriculture et Agroalimentaire Canada (AAC) qui a offert son support lors de la perte du directeur de recherche ainsi que leur soutien financier nécessaire pour poursuivre mes recherches.

Finalement, j'aimerais remercier le Fonds de recherche Nature et Technologies ainsi que le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et Génie pour m'avoir attribué des bourses qui ont grandement contribué au soutien financier nécessaire lors de la réalisation de mes recherches.

# TABLE DES MATIÈRES

1 INTRODUCTION ..... 1
2 REVUE DE LITTÉRATURE ..... 3
2.1 Le genre *Campylobacter* ..... 3
2.2 Les espèces pathogènes ..... 3
2.3 Facteurs de virulence, cibles cellulaires de l'hôte et mécanismes de l'infection ..... 5
2.4 *Campylobacter* spp. chez les animaux ..... 6
2.5 *Campylobacter* spp. dans l'eau ..... 6
2.6 Cas de contamination ..... 7
2.7 Difficultés pour l'étude de *Campylobacter* ..... 8
2.8 Méthodes moléculaires de détection ..... 10
2.9 Sources de contamination ..... 10
2.10 Identification phénotypique de *Campylobacter* spp. ..... 11
2.11 Résistance aux antibiotiques ..... 11
2.12 Facteurs de virulence ..... 13
3 MATÉRIEL ET MÉTHODE ..... 15
3.1 Les souches références utilisées ..... 15
3.2 Le prélèvement des échantillons ..... 15
3.3 La quantification de *Campylobacter* spp. par la méthode d'ensemencement direct (2010) ..... 19
3.4 La quantification de *Campylobacter* spp. par la méthode du nombre le plus probable 21
3.5 Technique moléculaire de caractérisation des isolats au niveau du genre et de l'espèce ..... 24
3.6 Optimisation d'une méthode mPCR pour la détection des gènes de virulence, de production de cytotoxines et de résistance à la tétracycline ..... 27
3.7 Application des protocoles de mPCR pour la détection des gènes de virulence, de production de cytotoxines et de résistance à la tétracycline ..... 29
3.8 Séquençage des gènes de virulence, des gènes de production de cytotoxines et du gène de résistance à la tétracycline ..... 29
4 RÉSULTATS ..... 31
4.1 La localisation des sites ..... 31

4.2 Comparaison de la méthode NPP et la méthode d'ensemencement direct pour la quantification de *Campylobacter* (2010) ..... 31
4.3 Caractérisation au niveau du genre et de l'espèce des isolats obtenus (2010-2012) .. 34
4.4 Quantification de *Campylobacter* spp. pour tous les sites (2010-2012) ..... 38
4.5 Optimisation de mPCR pour la détection simultanée de plusieurs gènes de virulence, gènes de production de cytotoxines et gène de résistance à la tétracycline ..... 43
4.6 Détection des gènes de virulence, gènes de production de cytotoxines et du gène de résistance à la tétracycline ..... 44
5 DISCUSSION ..... 49
5.1 La sélection des sites selon les résultats de présence/absence de *Campylobacter* .... 49
*5.2* La méthode de quantification des isolats aquatiques de *Campylobacter* ..... 52
5.3 L'espèce dominante ..... 52
5.4 Quantification de *Campylobacter* ..... 54
5.5 Détection de gènes par PCR multiplex ..... 54
6 CONCLUSION ..... 57

# LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Schéma représentant les routes de transmission possibles et vérifiées de *Campylobacter jejuni*. ..... 8

Figure 3.1 : Carte des sites MST («microbial source tracking») d'échantillonnage pour les prélèvements servant à la quantification de *Campylobacter* spp. du bassin versant de la rivière South Nation ..... 16

Figure 3.2 : Schématisation du protocole d'ensemencement direct (DP) pour la quantification de *Campylobacter* spp. à partir des échantillons d'eau du bassin versant de la rivière South Nation. ..... 21

Figure 3.3 : Schématisation du protocole nombre le plus probable (NPP) pour la quantification de *Campylobacter* spp. à partir des échantillons d'eau du bassin versant de la rivière South Nation ..... 23

Figure 3.4 : Utilisation du logiciel MPN calculator avec les paramètres un test de 500 mL, cinq tests de 100 mL et cinq tests de 10 mL ..... 24

Figure 4.1 : Comparaison entre la méthode du nombre le plus probable (NPP) et la technique d'ensemencement direct pour la récupération de *Campylobacter* spp. des échantillons d'eau obtenus des sites MST-5, MST-18, MST-19, MST-20 et MST-21 en 2010 ..... 32

Figure 4.2 : Comparaison entre différents milieux de culture utilisés avec la technique d'ensemencement direct pour la récupération de *Campylobacter* spp en 2010 ..... 33

Figure 4.4 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose obtenu après l'amplification des gènes en mPCR avec BSA et sans BSA ..... 43

Figure 4.5 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose d'une mPCR ne nécessitant pas de DMSO ou de BSA. ..... 44

Figure 5.1 : Localisation des sites ..... 51

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1 : Description sommaire des techniques de prélèvements et des sites du bassin versant de la rivière South Nation en 2009 et des environs utilisés pour la quantification de *Campylobacter* spp. Ce tableau a été obtenu grâce au travail de l'équipe du Dr. David Lapen. 18

Tableau 3.2 : Conditions de PCR avec les amorces universelles et pour la caractérisation au niveau du genre et de l'espèce des isolats ..... 26

Tableau 3.3 : Conditions de mPCR pour la détection des gènes de virulence, de production de cytotoxines et du gène de résistance à la tétracycline *tet(O)* chez *C. jejuni* ..... 28

Tableau 3.4 : Réactifs pour la PCR de séquençage avec la polymérase Taq titanium ..... 30

Tableau 4.1 : Nombre d'isolats obtenus avec les différents milieux et techniques ainsi que leur affiliation aux espèces *Campylobacter* avec les PCR décrites dans le tableau 3.2 ..... 33

Tableau 4.2 : Affiliation des isolats aux *Campylobacter* obtenus en 2010 (NPP et DP) ..... 36

Tableau 4.3 : Affiliation des isolats aux *Campylobacter* obtenus en 2011 (NPP) ..... 36

Tableau 4.4 : Affiliation des isolats aux *Campylobacter* obtenus en 2012 (NPP) ..... 37

Tableau 4.5 : Concentration en NPP/100 mL selon les dates et les sites d'échantillonnages de 2010. ..... 40

Tableau 4.6 : Concentration en NPP/100 mL selon les dates et les sites d'échantillonnages de 2011. ..... 41

Tableau 4.7 : Concentration en NPP/100 mL selon les dates et les sites d'échantillonnages de 2012. ..... 42

Tableau 4.8 : Nombre (pourcentage) de gènes de virulence, de gènes de production de cytotoxines et du gène de résistance à la tétracycline détecté chez les isolats caractérisés comme étant *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* en 2010 ..... 45

Tableau 4.9 : Résultats de séquençage de différent gène avec des souches références et quelques isolats obtenus de l'eau du bassin versant de la rivière South Nation ..... 46

# LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

$(NH_4)_2SO_4$ : sulfate d'ammonium

°C : Degrés Celsius

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

BSA : albumine de sérum bovin

DMSO : diméthylsulfoxyde

dNTPs : désoxynucléotide triphosphate

DP : « direct plating » ou ensemencement direct

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EPBH : évaluation des pratiques de gestion bénéfiques à l'échelle des bassins hydrographiques

HCl : acide chlorhydrique

$MgCl_2$ : chlorure de magnésium

mPB : « modified Preston Broth » ou bouillon Preston modifié

mPCR : réaction de polymérisation en chaîne multiplexe

MST : « microbial source tracking »

NPP : nombre le plus probable

pb : paire de bases

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

pH : potentiel hydrogène

qPCR : réaction de polymérisation en chaîne quantitative

Spp. : espèces

TAE : tampon tris, acétate et EDTA

V : volt

Var. : variété

VBNC : viable, mais non cultivable

# 1 INTRODUCTION

Dans l'optique de déterminer les impacts causés par l'épandage de fumier sur la qualité des eaux de surface, une étude de plusieurs années et de très grande envergure doit être réalisée. La détection et la quantification de pathogènes humains dans les eaux de surface sont des étapes cruciales dans ce long projet. Les pathogènes quantifiés (*Arcobacter* spp., *Campylobacter* spp. et *Escherichia coli*) proviennent vraisemblablement des animaux ou de leurs excréments, car plusieurs articles mentionnent leur présence chez les animaux de ferme, dans les fèces de ces animaux, dans le fumier et même dans les produits de consommation préparés à partir d'animaux contaminés (Cloak *et al.*, 2002; Mayr *et al.*, 2010; Denis *et al.*, 2011; Sheppard *et al.*, 2011). Ces pathogènes représentent un réel danger pour la santé humaine, que ce soit au niveau de la consommation de produits alimentaires ou d'eaux contaminés ou même lors de la pratique d'un sport nautique dans des eaux de surface souillées. Certaines de ces bactéries peuvent causer des infections très sévères, en plus d'avoir des effets à long terme comme le syndrome du côlon irritable ou l'arthrite (Ajene *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2014).

Le présent document porte sur la quantification et la caractérisation du pathogène humain *Campylobacter* spp. Il s'agit d'un pathogène émergent connu depuis quelques années. L'intérêt pour les *Campylobacter* dans la communauté scientifique ne fait qu'augmenter et il y a de plus en plus d'espèces qui s'ajoutent déjà à la longue liste des *Campylobacter*. La quantification de *Campylobacter* dans l'eau est relativement récente et peut être parfois difficile vu les caractéristiques fastidieuses (microaérophile, 42 °C, milieux de croissance enrichis, etc.) de croissance de ce genre bactérien. Différentes techniques de croissance ont donc été utilisées afin de récupérer le maximum d'isolats des eaux de surface. Cependant, l'utilisation des différentes méthodes d'isolement des bactéries est très coûteuse et pénible. Un choix guidé par les résultats obtenus des différentes techniques d'isolement a donc été fait pour ce projet. Ce choix a été basé sur la simplicité de la méthode, les coûts engendrés, le nombre d'espèces pouvant être isolées, la sélectivité de la technique pour récupérer seulement les *Campylobacter* spp. et la rapidité d'utilisation. Plusieurs études ont utilisé la méthode de nombre le plus probable, ce qui a été une des prémisses du présent projet.

En plus de ne pas trouver beaucoup d'études qui faisaient mention de la présence de *Campylobacter* dans les eaux de surface, il a été presque impossible de trouver des articles qui ont déterminé la pathogénicité des isolats aquatiques. Cela reste donc encore un mystère et

dans le but d'en connaître davantage sur ce point, chaque isolat *Campylobacter* récupéré lors de la quantification en 2010 a été soumis à la détection de plusieurs gènes de virulence et gènes de production de cytotoxines. Cependant, la détection des gènes de virulence ne permet pas de déterminer si les isolats expriment réellement ces gènes et s'ils représentent vraiment un danger pour la santé humaine. De plus, les gènes qui ont été détectés dans cette étude sont en majeure partie des gènes hypothétiques, c'est-à-dire que ces gènes sont potentiellement reliés à la virulence des *Campylobacter*, mais que la preuve de cette implication n'a pas encore été établie. Néamoins, cette étude est la première à se faire avec des isolats aquatiques et elle a permis d'approfondir les connaissances en ce qui a trait aux gènes de virulence chez *Campylobacter* et peut-être pourrait-elle motiver des gens à poursuivre ou à commencer des recherches sur l'expression et l'implication de ces gènes putatifs dans les infections humaines.

L'étude suivante avait donc plusieurs objectifs : (I) déterminer que la méthode NPP est réellement plus efficace que la méthode d'ensemencement direct pour la quantification des *Campylobacter*, (II) quantifier et caractériser les isolats aquatiques *Campylobacter* afin de définir les espèces présentes et récupérées ainsi que les espèces dominantes, et (III) déterminer la virulence ou les dangers reliés aux isolats retrouvés dans l'eau en détectant de nombreux gènes de virulence, les gènes de production de cytotoxines ainsi que le gène de résistance à la tétracycline *tetO*.

# 2 REVUE DE LITTÉRATURE

## 2.1 Le genre *Campylobacter*

Les *Campylobacter* ont premièrement été associés au genre *Vibrio*, mais en 1963 Sebald et Veron ont établi le genre *Campylobacter,* car les membres de ce groupe diffèrent par la composition de leur ADN et par leur habilité à croître en présence d'une quantité réduite d'oxygène (Sebald *et al.*, 1963; Corry *et al.*, 1995). Le genre *Campylobacter* fait partie d'une lignée phylogénétique appelée la sous-division epsilon des protéobactéries et il est inclus dans la famille des *Campylobacteraceae* (Vandamme *et al.*, 1991). Les membres de cette famille sont des bactéries à Gram-négatif, avec le besoin d'un environnement microaérophile pour la croissance. Ils ont en commun un faible contenu génétique en G et C, et ne forment pas de spores. De plus, ils sont tous motiles grâce à la présence d'un ou deux flagelles qui permettent à ces bactéries de faire des mouvements en tire-bouchon (Gao *et al.*, 2014).

Les premières espèces à intégrer le genre ont été *C. fetus* et *C. bubulus* qui étaient auparavant nommés *Vibrio fetus* et *Vibrio bubulus. C. fetus* a été isolés de fœtus avortés de moutons par McFadyean et Stockman en 1913, de fœtus avortés de bovins (Smith *et al.*, 1919) et de cultures de sang de femme ayant avorté spontanément (Vinzent *et al.*, 1947). *C. bubulus* a été isolé du vagin et du sperme de bovins (Florent, 1953). Depuis, plusieurs autres espèces ont été découvertes chez les animaux malades et sains, et chez les humains. Actuellement, on dénombre 22 espèces et 8 sous-espèces (Debruyne *et al.*, 2009) dont plusieurs sont reconnues ou suspectées d'être des pathogènes pour les humains ou les animaux. Il est aussi possible de retrouver certaines espèces du genre *Campylobacter* comme organisme commensal chez les animaux (Debruyne *et al.*, 2008).

## 2.2 Les espèces pathogènes

Parmi les espèces du genre *Campylobacter,* il y en a trois qui sont le plus souvent isolées des humains soit *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari. Campylobacter jejuni* est sans aucun doute l'espèce dominante dans les cas de maladies chez les humains, car elle est responsable de plus de 90 % des infections, tandis que *C. coli* et *C. lari* sont seulement isolés dans moins de 10 % et 1 % des cas d'infections, respectivement (Friedman, 2000; Gillespie *et al.*, 2002; Van Dyke *et al.*, 2010). Cependant, il existe plusieurs autres espèces de *Campylobacter* qui sont

aussi des pathogènes humains reconnus ou suspectés comme : *C. fetus, C. gracilis, C. showae, C. upsaliensis, C. rectus, C. sputorum* et *C. curvus*. Afin de bien comprendre les dangers reliés à une infection par *Campylobacter,* les paragraphes suivants décriront certaines espèces qui sont impliquées dans les infections chez les humains ou soupçonnées de l'être. Afin de ne pas alourdir le texte, la liste suivante des pathogènes n'est pas exhaustive, il s'agit simplement d'un survol rapide de certaines espèces isolées de patients souffrant de différentes maladies.

Les différentes souches de *C. sputorum* ont été retrouvées chez les animaux (fèces de moutons et de cochons, etc.) et les humains (cavité orale, lésions, fèces, etc.). Toutefois, la pathogénicité de cette espèce est toujours inconnue.

*Campylobacter gracilis* a été retrouvé dans plusieurs cas d'infections des tissus, tels que des infections de la tête, du cou et des viscères. De plus, ce pathogène possède souvent une multi-résistance aux antibiotiques (Debruyne *et al.*, 2008).

*Campylobacter rectus* est décrit comme un pathogène pouvant causer des maladies parodontales. Certaines souches ont été isolées de crevasses gingivales d'humains, dans des cas d'appendicites, chez les patients souffrant de l'œsophage de Barrett et d'abcès extraoraux. *C. showae* est aussi retrouvé au niveau de la bouche, dans la plaque dentaire et les lésions du parodonte (Debruyne *et al.*, 2008).

L'espèce *Campylobacter lari* a été décrite pour la première fois en 1983 par Benjamin et son équipe. Elle a été isolée du contenu de l'intestin de différents animaux, de mouettes, de l'eau de rivière et de fruits de mer. Il est aussi possible de retrouver cette bactérie chez des patients sains et immunodéficients souffrant de diarrhée et de bactériémie (Benjamin *et al.*, 1983; Debruyne *et al.*, 2008; Debruyne *et al.*, 2009).

*Campylobacter upsaliensis* est maintenant reconnue à travers le monde comme un pathogène entérique humain. Dans certaines régions, il serait même l'espèce la plus fréquemment isolée de fèces humaines après *C. jejuni* (Debruyne *et al.*, 2008). En plus de causer des diarrhées aigües ou chroniques, *C. upsaliensis* a été impliquée dans des cas de syndrome hémolytique et urémique (Carter *et al.*, 1996) et d'avortements spontanés chez les humains (Gurgan *et al.*, 1994).

L'espèce *Campylobacter fetus* est décrite comme l'espèce type du genre *Campylobacter*, elle comprend deux sous-espèces *C. fetus* var. *fetus* et *C. fetus* var. *venerealis*. La sous-espèce *C. fetus* var. *fetus* peut causer des défaillances chez les animaux (avortement

spontané) en plus de pouvoir causer des infections systémiques chez les patients immunodéficients, des septicémies chez les nouveau-nés et des fausses couches (Debruyne *et al.*, 2008). La sous-espèce *C. fetus* var. *venerealis* se retrouve plus particulièrement chez les animaux, où elle peut causer la stérilité, l'avortement et la mort du fœtus et selon les études publiées jusqu'à présent, elle n'a jamais été isolée des humains sains ou malades.

L'espèce *Campylobacter coli* a été isolée pour la première fois de selle de porcs ayant la diarrhée (Doyle, 1948) et était inclus dans le genre *Vibrio* avant la création du genre *Campylobacter* en 1963. *C. coli* serait responsable de 5 à 10 % des cas de gastro-entérites, et est donc considérée comme un pathogène humain important.

Finalement, *C. jejuni* a été découvert dans des fèces de vaches ayant la diarrhée (Jones *et al.*, 1931), dans des cultures de sang d'humains atteints de gastro-entérites (Levy, 1946; King, 1957) et de fœtus de moutons avortés (Bryans *et al.*, 1960). Cette espèce bactérienne est la principale source de gastro-entérites chez les humains (Friedman, 2000; Miller *et al.*, 2005) et il est le pathogène isolé dans 90 % des cas. De plus, une infection par *C. jejuni* serait un des facteurs pouvant causer des complications post-infection comme le syndrome de Guillain-Barré ou l'arthrite réactive. *C. jejuni* var. *doylei* est isolé d'échantillons fécaux humains et il est associé avec des cas de bactériémie. La souche *C. jejuni* var. *jejuni* est celle qui est la plus fréquemment retrouvée chez les patients souffrant de gastro-entérites (Morey, 1996; Debruyne *et al.*, 2008; Lastovica *et al.*, 2008).

*C. jejuni* et *C. coli* sont deux espèces très similaires autant au niveau du phénotype que du génotype. Leur grande ressemblance cause des problèmes lorsque vient le temps d'identifier les bactéries ou de faire un diagnostic. Cette similarité serait due au fait que le génome de *C. coli* contient beaucoup de gènes qu'on retrouve aussi chez *C. jejuni* (Debruyne *et al.*, 2008).

## 2.3 Facteurs de virulence, cibles cellulaires de l'hôte et mécanismes de l'infection

Lors d'une infection, le pathogène *Campylobacter* va adhérer ou envahir les cellules épithéliales du système digestif de son hôte (Backert *et al.*, 2013). L'infection provoque des changements au niveau des cellules humaines par le biais de la sécrétion de protéines, de toxines et d'autres molécules par *Campylobacter.* Ces changements incluent une stimulation ou une inhibition de la transduction du signal entre les cellules de l'hôte, l'augmentation de la

production de cytokines, l'apparition d'inflammation, la mort cellulaire et une mauvaise absorption ou sécrétion d'eau. Ces changements dans les cellules de l'hôte provoquent l'apparition des symptômes de gastro-entérites comme les crampes abdominales et la diarrhée (Hu *et al.*, 2008). La motilité et la forme de cette bactérie lui permettent de pénétrer rapidement le mucus qui tapisse les intestins (Blaser *et al.*, 2008).

## 2.4 *Campylobacter* spp. chez les animaux

Les *Campylobacter* peuvent provenir de plusieurs sources environnementales, mais se retrouvent également chez une grande variété d'animaux. Chez certains hôtes, certaines espèces de *Campylobacter* peuvent causer des maladies, des avortements spontanés, la stérilité, mais la plupart du temps ces microorganismes vivent en symbiose dans le tractus gastro-intestinal des animaux (Hannon *et al.*, 2009). Plus de 50 % des cochons, des poulets et des dindes sont colonisés par *Campylobacter.* Ces colonisations sont généralement asymptomatiques et servent de réservoir naturel pour ces pathogènes (Gregory *et al.*, 1997; Altrock *et al.*, 2006; Minvielle *et al.*, 2007; Varela *et al.*, 2007; Willey, 2008). L'espèce dominante chez le bœuf est *C. jejuni,* et chez le porc, *C. coli.* La viande de porc pourrait être un facteur important des infections par *C. coli* chez les humains (Stern *et al.*, 1992; Steele *et al.*, 1998; Kramer *et al.*, 2000; Pezzotti *et al.*, 2003). Les animaux de ferme, plus particulièrement les poulets, seraient la principale source d'infection pour les humains (Sheppard *et al.*, 2009; Strachan *et al.*, 2009; Mullner *et al.*, 2010; Pires *et al.*, 2010).

## 2.5 *Campylobacter* spp. dans l'eau

On retrouve *Campylobacter* dans les eaux de surface tels les lacs et les rivières. Cette contamination pourrait provenir des animaux domestiques ou sauvages, des effluents et du ruissellement des terres agricoles (Moore *et al.*, 2001). Les eaux de surface peuvent par la suite contaminer les animaux sauvages ou domestiques lorsqu'ils s'y abreuvent, les aliments cultivés si les eaux de surface sont utilisées pour arroser les terres agricoles, et les humains lors d'activités aquatiques. Il est parfois ardu d'isoler des souches aquatiques de *Campylobacter,* car leur concentration est très faible. De plus, comme l'eau est habituellement un environnement hostile avec peu de nutriments, les micro-organismes ont tendance à adopter un état viable, mais non cultivable (VBNC) ou former des biofilms (Reeser *et al.*, 2007). Les bactéries qui se retrouvent sous forme de biofilm dans l'eau sont difficiles à prélever; il faut

déloger le biofilm pour se faire, tandis que les cellules VBNC doivent être ressuscitées en utilisant un bouillon d'enrichissement et différents paramètres de croissance avant de pouvoir les cultiver sur milieux (Corry *et al.*, 1995; Chaveerach *et al.*, 2003).

## 2.6 Cas de contamination

Il est possible de contracter *Campylobacter* lors de la consommation de poulet, de lait non pasteurisé, d'huîtres, etc. Cependant, il est rare qu'une épidémie de *Campylobacter* provienne de ces sources. Les épidémies surviennent surtout lorsque le système d'eau potable est contaminé par le biais d'un bris d'équipement ou d'une mauvaise décontamination de l'eau. De plus, les eaux de surface jouent un rôle dans les épidémies chez les humains et pourraient aussi être responsables de la contamination des animaux de ferme (Jacobs-Reitsma *et al.*, 2008). Plusieurs études (Blaser *et al.*, 1983; National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, 1994; Koenraad *et al.*, 1997; European Food Safety Authority, 2005) ont démontré que la contamination des eaux de surface serait due à de la contamination fécale provenant d'oiseaux sauvages, d'animaux domestiques ou d'effluents d'eaux usées.

Les épidémies d'infection par *Campylobacter* surviennent surtout lors de la consommation d'eaux contaminées, comme ça a été le cas en 1985 à Orangeville en Ontario. Les résidants ont consommé de l'eau contaminée provenant d'une source souterraine non-chlorée, ce qui a provoqué des gastro-entérites par *C. jejuni* chez 241 d'entre eux (Millson *et al.*, 1991). Quinze ans plus tard, une autre épidémie est survenue; cette fois-ci, 2300 personnes ont souffert de gastro-entérites causées par la présence de *Campylobacter* et de la souche pathogène *Escherichia coli* O157:H7 dans l'eau potable de la ville de Walkerton, Ontario (Health Canada, 2000; Clark *et al.*, 2003).

Au Canada, il est très probable que le nombre d'infections par *Campylobacter* soit largement sous-estimé dû au fait que les gastro-entérites nécessitent rarement l'attention d'un médecin. Présentement, les experts estiment que le nombre d'infections par *Campylobacter* est entre 2 et 3 fois plus important que le nombre d'infections par *E. coli* et *Salmonella* combinées (Thomas *et al.*, 2006). En 2004, 9345 cas de gastro-entérites associés à une infection par *Campylobacter* ont été rapportés au Canada, ce qui a mené ce type d'infection au premier rang des maladies entériques contractées par le biais de produits alimentaires et d'eaux contaminées (http://dsolsmed.phac-aspc.gc.ca) bien que plusieurs autres facteurs puissent être responsables d'une infection (voir figure 2.1). La consommation de poulet, de lait non

pasteurisé et d'eau non traitée seraient les principaux facteurs de risque pour contracter une infection par *C. jejuni (*Miller *et al., 2005).* D'autres études affirment que la consommation du poulet, surtout s'il n'est pas assez cuit, et la contamination croisée qui peut survenir lors de la manipulation de cette viande sont les facteurs responsables de la plus grande majorité des infections chez l'humain (Anonyme, 2002; Graham *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2006). De plus, la consommation d'eau, volontaire ou non, lors de la baignade ou d'autres activités aquatiques pourrait être un facteur de risque important pour contracter *Campylobacter* (Jacobs-Reitsma *et al.*, 2008).

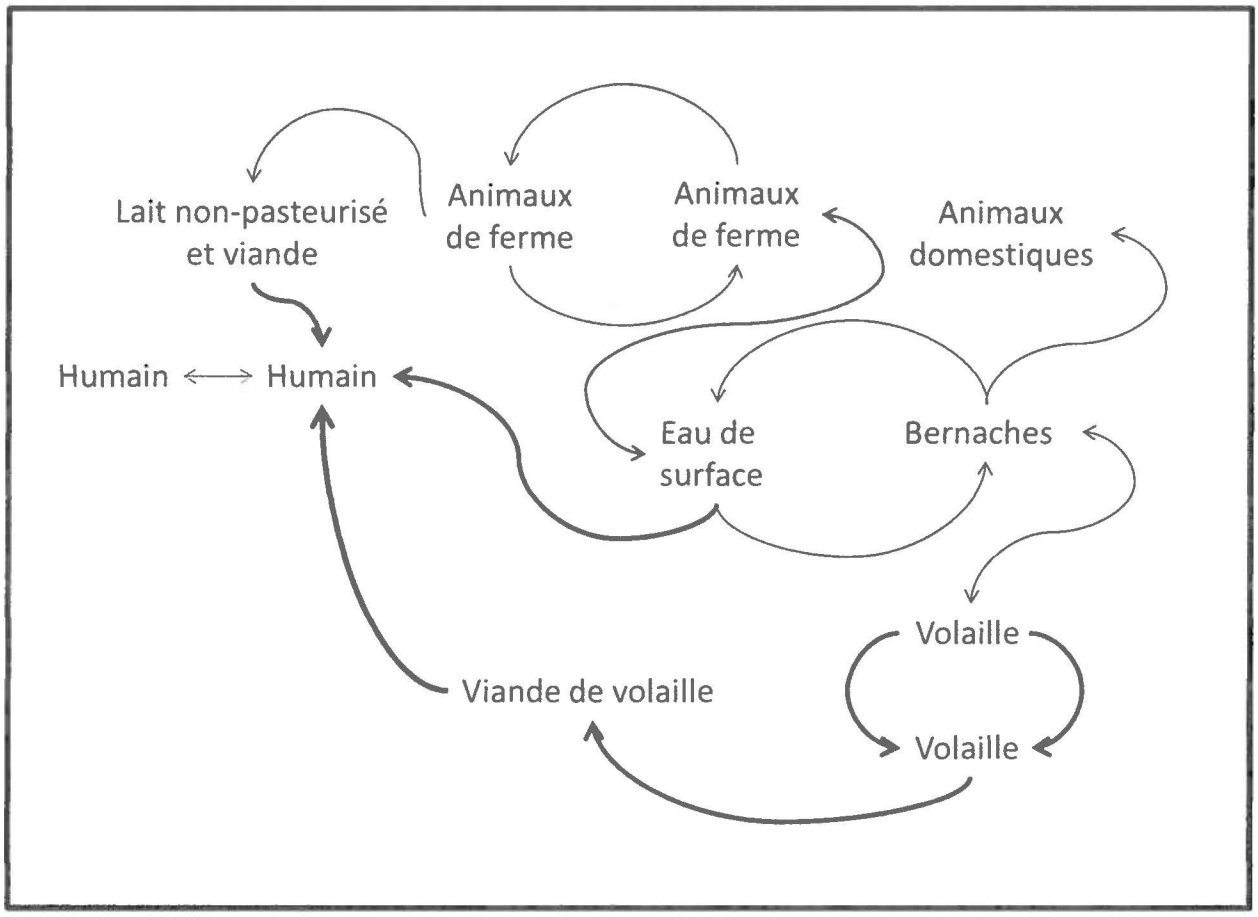


**Figure 2.1 : Schéma représentant les routes de transmission possibles et vérifiées de *Campylobacter jejuni*.** Modifié de (Olson *et al.*, 2008).

## *2.7* Difficultés pour l'étude de *Campylobacter*

Il est difficile de quantifier et même de détecter la présence de *Campylobacter* dans des échantillons de l'environnement comme l'eau ou le sol car les bactéries sont souvent endommagées ou stressées. Bien que les cellules soient encore vivantes, elles ne peuvent être

cultivées et sont dans un état VBNC (Van Dyke *et al.*, 2010). Pour que les VBNC redeviennent cultivables, certaines études ont utilisé des bouillons d'enrichissement (Corry *et al.*, 1995; Moore, 2000), et des températures d'incubation de l'enrichissement qui augmentent progressivement (Ehlers *et al.*, 1982) et ils repoussent l'ajout d'antibiotiques dans le bouillon plus loin dans le processus d'incubation afin de ne pas stresser inutilement les bactéries (Corry *et al.*, 1995). Malgré tous ces efforts, il se peut que cela ne fonctionne pas, en raison d'autres difficultés : la concentration très faible de *Campylobacter* dans certains échantillons de l'environnement et le caractère fastidieux de cette bactérie. C'est pourquoi il est primordial de développer des techniques de culture encore plus sensibles pour l'isolement et la quantification de ces pathogènes. En présence d'un échantillon qui contient une faible concentration de *Campylobacter*, il peut être favorable d'utiliser des étapes de filtration et d'enrichissement afin de concentrer les bactéries et d'en récupérer le plus possible (Hu *et al.*, 2011). À elle seule, la technique de filtration s'est avérée efficace pour augmenter le nombre de cellules récupérées dans des échantillons d'eau (Bolton *et al.*, 1982a; Ribeiro *et al.*, 1984; Rosef *et al.*, 1987; Stelzer *et al.*, 1988; Brennhovd *et al.*, 1992). La détection des pathogènes dans l'eau est primordiale surtout dans le cas de *Campylobacter* où l'ingestion de seulement 500 bactéries sont nécessaires pour causer une infection (Black *et al.*, 1988; Robinson 1981).

En ce moment, il n'existe pas de consensus sur la méthode d'isolement et d'énumération de *Campylobacter,* et ce parce qu'il est impossible d'isoler toutes les espèces de *Campylobacter* avec un seul et même protocole, et qu'il faut aussi adapter le protocole selon le type et la source de l'échantillon. Avant d'entreprendre une étude sur la détection de *Campylobacter,* il est nécessaire de déterminer les espèces visées, la nature des échantillons et leur provenance. Une fois que ces paramètres bien définis, il est possible d'utiliser un protocole déjà existant ou d'en adapter un afin d'isoler avec la meilleure efficacité possible les espèces d'intérêts des échantillons. Certaines conditions de croissance comme la température, la présence ou l'absence de certains gaz, la présence ou l'absence d'antibiotiques vont favoriser ou inhiber la croissance de certaines espèces de *Campylobacter.* Ces paramètres ont donc un impact sur les résultats et les espèces ou les souches isolées. Il est donc très ardu de déterminer hors de tout doute l'espèce qui prévaut dans l'échantillon. Pour contrer ces difficultés, certaines études suggèrent d'utiliser plusieurs méthodes, milieux et conditions de culture en parallèle afin de favoriser la croissance de plusieurs espèces (Hald *et al.*, 2000; Maher *et al.*, 2003; Habib *et al.*, 2008; Acke *et al.*, 2009). Cependant, ce genre d'analyse augmente grandement les coûts et le travail à effectuer pour chaque expérience, et dans plusieurs cas il est trop fastidieux d'utiliser plus d'une technique en même temps. Les

nombreuses méthodes d'isolement de *Campylobacter,* les différents techniques de surveillance et le manque de consensus parmi la communauté scientifique rendent difficile la comparaison entre les résultats obtenus des différentes études.

## 2.8 Méthodes moléculaires de détection

Les méthodes de culture actuelles pour le dénombrement des *Campylobacter* sont dispendieuses et fastidieuses. C'est pourquoi beaucoup d'études tentent de détecter ou de quantifier *Campylobacter* spp. par des techniques moléculaires. Depuis plusieurs années, la détection de *Campylobacter* spp. peut se faire en extrayant directement l'ADN de l'échantillon (environnemental ou fèces, par exemple) et en faisant une PCR conventionnelle, une PCR mutiplexe (mPCR) ou une PCR en cascade (Linton *et al.*, 1997; Bang *et al.*, 2002; Callicott *et al.*, 2005; Coste *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2013). Avec l'arrivée de nouvelle technologie comme la PCR quantitative, il est maintenant possible de quantifier avec précision en plus de détecter *Campylobacter* dans des échantillons complexes (environnement, fèces, sols, etc.) (Lund *et al.*, 2004; Botteldoorn *et al.*, 2008; Pitkänen *et al.*, 2009; Rinsoz *et al.*, 2009; Van Dyke *et al.*, 2010; Clark *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012). Pour quantifier *Campylobacter* à l'aide d'une technique de qPCR la première étape est d'extraire l'ADN total de l'échantillon, puis la qPCR peut se faire en utilisant des amorces spécifiques au genre ou aux différentes espèces. Cependant, lorsqu'une méthode de qPCR est utilisée, certaines difficultés causées par la présence d'inhibiteurs dans l'échantillon peuvent survenir. Il est donc important d'utiliser des méthodes rigoureuses d'extraction d'ADN et de réduire la présence des inhibiteurs de PCR. De plus, la qPCR ne permet pas une quantification exacte, car elle retrace aussi l'ADN des bactéries mortes. Il est donc impossible de déterminer le risque réel associé à l'échantillon. Comme aucune méthode de culture n'est utilisée, il est impossible d'obtenir des isolats pour faire des analyses de morphologie ou phénotypiques des différentes souches contenues dans l'échantillon.

## 2.9 Sources de contamination

Un des objectifs principaux de l'étude des *Campylobacter* à l'heure actuelle est le suivi des sources microbiennes «microbial source tracking». Ce genre d'étude tente entre autres de déterminer la provenance des isolats qui contaminent les animaux, ou des espèces pathogènes qui causent des maladies chez les humains. Pour se faire, il faut obtenir des isolats de deux sources, par exemple l'eau de surface et des échantillons fécaux d'animaux, qu'on croit reliées,

et ensuite il faut comparer génétiquement ces souches afin de faire des corrélations. Le suivi des sources microbiennes est difficile à mettre au point avec les *Campylobacter,* car ils peuvent provenir d'une multitude de sources (animaux de ferme, animaux sauvages, sols, eau, produits alimentaires, etc.). De plus, ceux-ci peuvent avoir des mutations spontanées et acquérir des plasmides ou les perdre facilement (Wassenaar *et al.*, 2000). Les progrès au niveau de la biologie des populations ont démontrés que les changements génétiques qui surviennent chez *C. jejuni* et *C. coli* sont la cause de recombinaisons, ce qui provoquent beaucoup de diversité génétique chez ces bactéries (Dingle *et al.*, 2001; Dingle *et al.*, 2005) et donc le suivi devient très difficile.

## 2.10 Identification phénotypique de *Campylobacter* spp.

Certaines études se basent sur l'identification des *Campylobacter* par la morphologie des colonies ou sur les analyses biochimiques de ces mêmes colonies pour ensuite confirmer avec des PCR la nature de ces colonies isolées (Acke *et al.*, 2009; Jacob *et al.*, 2011). Il est plutôt imprudent de se baser sur des tests biochimiques pour identifier des isolats de *Campylobacter*, car il existe différentes souches qui sont parfois atypiques (Acke *et al.*, 2009). De plus, la morphologie des colonies est dépendante du degré d'humidité du milieu (Buck *et al.*, 1981) et de la présence des dérivés inhibiteurs d'oxygène qui peuvent se former lors d'un entreposage inadéquat ou prolongé des milieux de culture (Corry *et al.*, 1995).

## 2.11 Résistance aux antibiotiques

Certains plasmides présents chez *Campylobacter* et portant des gènes codants pour la résistance à la tétracycline, à la kanamycine et au chloramphénicol ont été identifiés (Trieber *et al.*, 2000). La tétracycline et le chloramphénicol sont des antibiotiques utilisés lorsqu'une infection persiste après un premier traitement avec un autre antibiotique, par exemple l'érythromycine. Jusqu'à 60 % des souches sont résistances à la tétracycline (Blaser *et al.*, 2008). Le gène de résistance à la tétracycline *tetO* se retrouve sur un plasmide ou sur le chromosome en serait responsable. Le plasmide contenant ce gène peut être échangé rapidement entre différentes espèces de *Campylobacter* (Batchelor *et al.*, 2004; Gibreel *et al.*, 2004; Nirdnoy *et al.*, 2005; Pratt *et al.*, 2005), et s'il se trouve sur les chromosomes, il peut être transmis rapidement par le biais de transformation génétique (Avrain *et al.*, 2004). De plus, la tétracycline serait capable de persister pendant une certaine période dans l'environnement et

ainsi les bactéries seraient en contact prolongé avec cet antibiotique et développeraient une résistance (Frost, 1991).

Des antibiotiques comme la pénicilline, les céphalosporines et le triméthoprime peuvent être inefficace contre toutes les souches de *C. jejuni* et *C. coli* (McNulty, 1987; Skirrow *et al.*, 1995). Bien que la résistance à la tétracycline des isolats *Campylobacter* soit inquiétante par son ampleur grandissante et la facilité de transfert du gène responsable, il existe d'autres antibiotiques très efficaces. Dans la plupart des cas de gastro-entérites, l'érythromycine est utilisée, car *C. jejuni* est l'espèce responsable de 90 % des cas de gastro-entérites, et que l'incidence de la résistance à l'érythromycine chez cette espèce est seulement de 0 et 12 % (Gibreel *et al.*, 2006). De plus, d'autres études ont démontré que les fluoroquinolones (ex. : ciprofloxacine) s'avèrent aussi efficaces que l'érythromycine contre les gastro-entérites causées par des pathogènes humains (Piddock, 1995; Wiström *et al.*, 1995). Cependant, la résistance aux fluoroquinolones se développe très rapidement chez les isolats *Campylobacter* (Adler-Mosca *et al.*, 1991). Avant les années 1990, les isolats résistants aux quinolones étaient plutôt rares. Maintenant avec l'utilisation des dérivés de ciprofloxacine en médecine vétérinaire et les fluoroquinolones pour le traitement des maladies chez les humains, on observe une augmentation rapide du taux d'isolats résistants (Adler-Mosca *et al.*, 1991; Agunos *et al.*, 2013; Rautelin *et al.*, 1991; Reina *et al.*, 1992; Chatzipanagiotou *et al.*, 1993).

Les souches *Campylobacter* résistantes aux fluoroquinolones ont le même potentiel de colonisation et de persistance que les souches non résistantes même en absence des antibiotiques (Luo *et al.*, 2005). De plus, lorsque les souches résistances et non résistantes étaient en compétition pour la colonisation de l'hôte, les souches résistantes ont pris le dessus. Habituellement, lorsqu'une souche devient résistante par le biais d'une mutation, elle perdra aussi de l'efficacité au niveau de sa pathogénicité : croissance plus lente, diminution de l'habileté à la compétition, et persistance écourtée dans l'hôte et l'environnement. Cependant, les résultats de Luo et al. (2005) suggèrent que la mutation au niveau du gène *gyrA* confère à la bactérie la résistance aux fluoroquinolones en plus d'augmenter son efficacité pour infecter les hôtes. D'autres études (Price *et al.*, 2005; Price *et al.*, 2007) démontrent que même après plusieurs années suivant l'abolition de l'utilisation des fluoroquinolones chez les poulets, les souches *Campylobacter* résistantes aux fluoroquinolones dominaient dans ce genre d'élevages et que les bactéries résistantes colonisaient plus facilement les poulets lorsqu'elles sont comparées aux bactéries non résistantes (Han *et al.*, 2008). En comparaison, la résistance aux macrolides survient plus rarement parce que le taux des mutations spontanées qui confèrent la

résistance aux macrolides est beaucoup plus bas (Zhang *et al.*, 2008). De plus, en seulement 24 heures, *Campylobacter* peut développer une résistance aux fluoroquinolones (Luo *et al.*, 2003), tandis qu'il faut une période prolongée, jusqu'à quelques semaines, pour que les bactéries développent une résistance aux macrolides (Lin *et al.*, 2007) et pour une bactérie être résistance aux macrolides pourrait conférer un désavantage quant à la colonisation de son hôte (Luangtongkum *et al.*, 2012).

L'utilisation abusive, intensive ou non appropriée des antibiotiques tant au niveau de l'agriculture qu'au niveau des traitements des maladies chez les humains serait responsable du taux croissant d'isolats *Campylobacter* résistants aux antibiotiques. Les fluoroquinolones et les macrolides sont les deux classes d'antibiotiques de préférence pour traiter les gastro-entérites causées par *Campylobacter,* et la tétracycline est utilisée dans les cas d'infection persistante chez les êtres humains. Le taux grandissant d'isolats multirésistants est très inquiétant pour la santé publique, car il n'y a pas beaucoup d'autres options pour une thérapie par voie orale (Allos *et al.*, 2009).

La résistance aux antibiotiques se développe lorsque les bactéries sont soumises à une pression de sélection en présence d'un antibiotique. Lorsque l'antibiotique est retiré du processus pour une période prolongée, la pression de sélection est absente et donc les bactéries ne devraient plus être résistantes. Pourtant ce n'est pas le cas. Des poulets d'une ferme biologique qui n'a pas utilisé d'antibiotiques pour au moins trois ans étaient porteurs de souches de *Campylobacter* résistantes à l'érythromycine, à la tétracycline, à l'azithromycine et à la clindamycine (Thibodeau *et al.*, 2011). Même en absence de pression de sélection, certains isolats résistants peuvent persister plus efficacement que les isolats non résistants, ce qui va à l'encontre de bien des résultats précédents (Zhang *et al.*, 2003).

## 2.12 Facteurs de virulence

La motilité, l'adhérence, l'invasion, les protéines sécrétées, la survie intracellulaire et la production de toxines sont tous des facteurs qui jouent un rôle dans la pathogénicité des bactéries (Larson *et al.*, 2008). Les espèces *Campylobacter* sont généralement dotées d'un ou deux flagelles qui leur permettent d'être mobiles. Afin de coloniser ou d'infecter les poulets et les humains, il est primordial pour *C. jejuni* de posséder un flagelle (Newell *et al.*, 1985; Black *et al.*, 1988; Hendrixson, 2006). Le flagelle joue un rôle important dans l'adhérence et l'invasion

des cellules de l'hôte (Konkel *et al.*, 1989; Wassenaar *et al.*, 1991; Carrillo *et al.*, 2004; Konkel *et al.*, 2004; Malik-Kale *et al.*, 2007).

Il existe aussi des protéines responsables de l'adhérence, comme la protéine de la membrane externe, CadF (*Campylobacter* adhesion to fibronectine). Cette protéine agirait comme une adhésine et permettrait l'adhérence aux cellules de l'hôte. Si CadF est absente, une baisse dans l'invasion des cellules est observée (Pei *et al.*, 1998; Monteville *et al.*, 2003; Ashgar *et al.*, 2007). Le gène *ciaB* (*Campylobacter* invasion antigen B) serait aussi impliqué dans les mécanismes d'invasion en codant pour une protéine sécrétée par les bactéries lorsqu'elles sont en contact avec des cellules épithéliales (Konkel *et al.*, 1999). La fibronectine adhésine CadF ainsi que l'antigène d'invasion CiaB seraient retrouvés chez toutes les espèces de *Campylobacter* (Miller, 2008).

DnaJ est reconnue comme une protéine de choc thermique qui est produite lors d'une augmentation de la température à 46°C. Une étude a démontré qu'elle était nécessaire pour la survie des bactéries lors d'un stress thermique et pour la colonisation des poulets (Konkel *et al.*, 1998). À ce jour, il existe très peu de facteurs de régulation connus qui affectent la réponse au choc thermique chez *Campylobacter*. Le premier facteur à avoir été découvert est une protéine nécessaire pour la croissance optimale à 42 °C et pour la colonisation des poussins, qu'on appelle RacR (reduced ability to colonize) (Bras *et al.*, 1999).

La bactérie *C. coli* possèderait une activité hémolytique grâce à la présence d'un gène codant pour la phospholipase A de la membrane externe (PldA) (Grant *et al.*, 1997). Un homologue du gène *pldA* peut être retrouvé chez *C. jejuni* et il serait aussi présent chez toutes les espèces de *Campylobacter*. Les *Campylobacter* ne sont pas les seuls à posséder la protéine PldA. Elle se retrouverait aussi chez *Helicobacter pylori* où elle conférerait une résistance au stress provoqué par l'acide (Tannæs *et al.*, 2001) et un avantage quant à la colonisation de l'estomac de l'hôte (Dorrell *et al.*, 1999).

La production de toxine de distension cytolétale chez *Campylobacter* est soupçonnée d'être un des facteurs de virulence primordiale lors d'une infection par cette bactérie. Cette toxine produite grâce aux gènes *cdtA*, *cdtB* et *cdtC* est excrétée et attaque les cellules de l'hôte et les bloque dans la phase G2 du cycle cellulaire, ce qui va causer la mort de la cellule par apoptose (Whitehouse *et al.*, 1998; Frisan *et al.*, 2001; Lara-Tejero *et al.*, 2001). La présence du plasmide pVir serait associée à des diarrhées sévères et sanglantes (Tracz *et al.*, 2005). Les gènes *flaA* et *flaB* codent pour le ou les flagelles retrouvés à extrémité d'une cellule *Campylobacter* (On *et al.*, 2008).

# 3 MATÉRIEL ET MÉTHODE

## 3.1 Les souches références utilisées

*C. jejuni* ATCC29428 et ATCC33291, *C. lari* ATCC35221 ainsi que la souche *C. coli* ATCC43478 ont été ensemencées sur du milieu Karmali (Karmali *et al.*, 1986) (43 g/L agar de base pour la culture de *Campylobacter*, Oxoid CM0935; 100 mg/L pyruvate de sodium; 32 mg/L céfopérazone; 20 mg/L vancomycine et 100 mg/L cycloheximide) et incubées dans un environnement microaérophile (5% $O_2$, 30% $H_2$, 10% $CO_2$ et 55% $N_2$, Praxair NICD10H02C-Q) à 42 °C pendant 48 heures. L'ADN a été ensuite extrait en incubant à 100 °C une colonie isolée dans 100 µL d'eau stérile pendant 10 minutes et par la suite dilué 1:100. L'ADN de ces souches a été utilisé afin d'optimiser les protocoles pour la caractérisation des isolats au niveau des trois espèces (*C. coli*, *C. jejuni* et *C. lari*) et afin d'optimiser la détection des gènes de virulence, de production de cytotoxine et de résistance à la tétracycline en PCR multiplexe.

## 3.2 Le prélèvement des échantillons

Les échantillons ont été recueillis du bassin de la rivière South Nation qui se trouve dans l'est de l'Ontario, Canada. La rivière South Nation est longue de 175 km et son réservoir couvre une étendue de 3900 km². Toutefois, les échantillons ont été recueillis d'une aire d'environ 200 km² afin de limiter les déplacements et les coûts d'échantillonnage (FIG. 3.1). L'intérêt porté au bassin de la rivière South Nation vient du fait que celui-ci est entouré de terres dont l'utilisation est variée : 60 % de l'étendue du bassin est utilisée pour l'agriculture tandis que 40% des sites sont utilisés pour le développement urbain et rural. De plus, les terres agricoles sont fertilisées avec du fumier au printemps et à l'automne (Wilkes *et al.*, 2009; Wilkes *et al.*, 2011; Sunohara *et al.*, 2012).

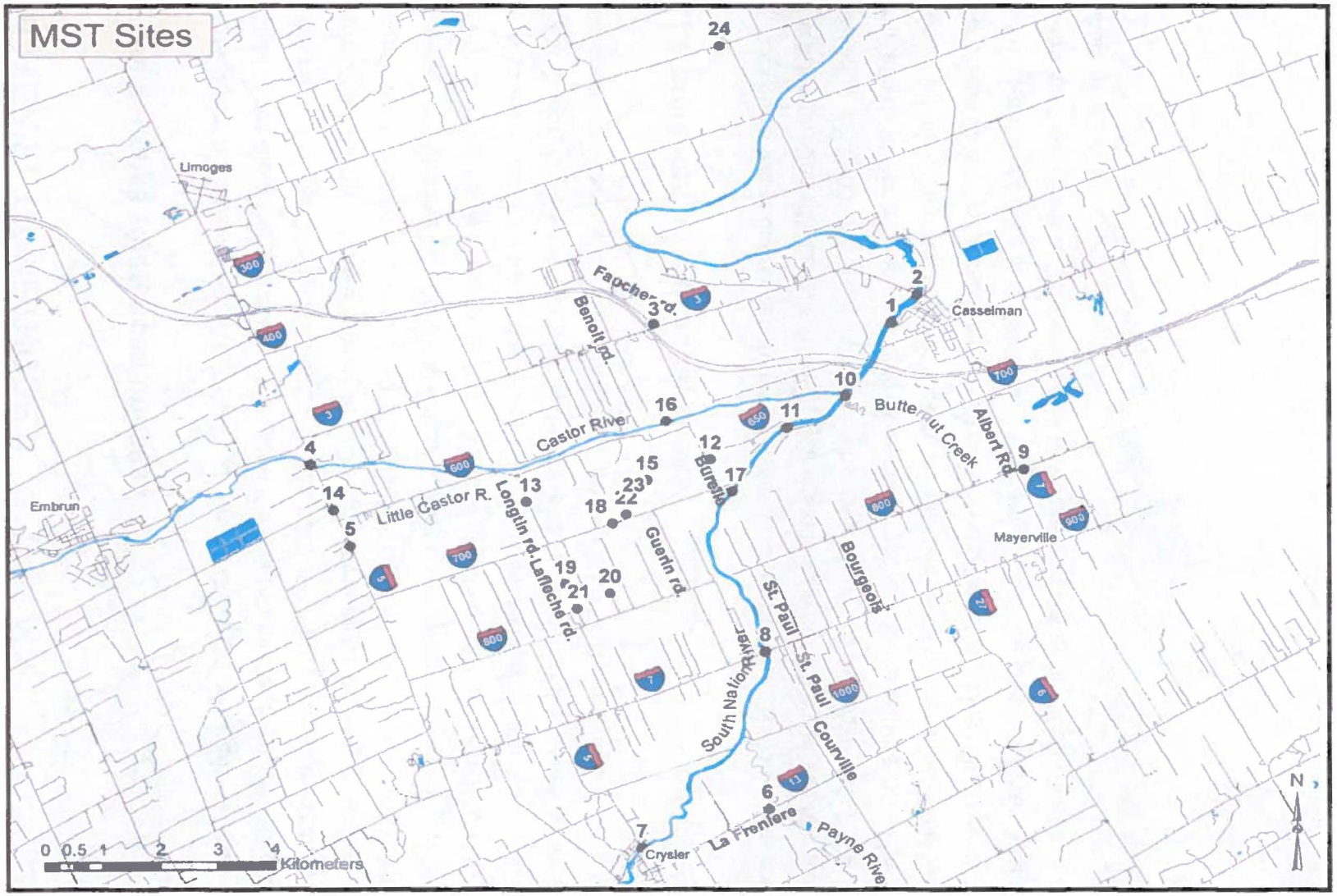


**Figure 3.1 : Carte des sites MST («microbial source tracking») d'échantillonnage pour les prélèvements servant à la quantification de *Campylobacter* spp. du bassin versant de la rivière South Nation**

En 2010, les échantillons ont été recueillis toutes les deux semaines entre les mois de juin et de novembre aux sites MST-5, MST-18, MST-19, MST-20 et MST-21. Ces sites avaient été choisis car, dans les études préliminaires entre 2004 et 2009, ils avaient une plus forte concentration de *Campylobacter* (Graham Wilkes, communication personnelle). En 2011 et 2012, les échantillons des sites MST-1, MST-5, MST-6, MST-8, MST-9, MST-18, MST-20, MST-22 et MST-24 ont été recueillis toutes les deux semaines entre les mois d'avril et de décembre. Ces sites avaient été préalablement choisis, car leur concentration en *Campylobacter* avait été importante ou afin d'observer les différences de concentrations entre des sites affectés par différents paramètres (proximité de terres agricoles, débit, etc. voir TABLEAU 3.1). Habituellement, des échantillons de deux litres d'eau ont été recueillis en submergeant des bouteilles stériles de polytéréphtalate d'éthylène (PET) (Systems Plus, Woodstock, Ontario, Canada) à une profondeur de 0,5 à 1 mètre sous la surface de l'eau. Les échantillons d'eau ont été ensuite gardés sur glace pour une période d'environ 24 heures avant d'être traités. Certains échantillons n'ont pas été recueillis de cette façon (détails dans tableau 3.1).

**Tableau 3.1 : Description sommaire des techniques de prélèvements et des sites du bassin versant de la rivière South Nation en 2009 et des environs utilisés pour la quantification de *Campylobacter* spp. Ce tableau a été obtenu grâce au travail de l'équipe du Dr. David Lapen.**

| Numéro du site | Lieu des prélèvements | Description |
|---|---|---|
| MST-1 | Casselman (ON); apport de l'usine de traitement des eaux | Le site de prélèvement des échantillons se situait à l'endroit où l'usine de traitement des eaux qui alimentait la communauté de Casselman prend son eau. La prise d'eau pour l'usine se faisait à environ 6 mètres de profondeur. Les échantillons ont été prélevés à l'intérieur de l'usine après 3-5 minutes de fonctionnement de la pompe d'alimentation. En amont il y avait du développement urbain et des terres agricoles servant à la culture de fèves de soya et de maïs. À environ 1,6 km en amont du site de prélèvement les cours d'eau rivière Castor et crique Butternut se déversent dans la rivière South Nation. |
| MST-5 | Rivière Little Castor | Les échantillons étaient collectés à partir d'un pont qui surplombait l'étendue d'eau. Deux fermes laitières se situaient à 70 m et à 700 m en amont du site de prélèvement. Ce site était plutôt entouré de marécages, forêts, pâturages et quelques champs abandonnés. En général, il était entouré de moins d'activité agricole que les autres sites. Cependant, plusieurs bernaches se retrouvaient à proximité du site de prélèvement et de l'épandage de fumier a été observé à 3 km. Ces paramètres pourraient influencer la qualité de l'eau. |
| MST-6 | Rivière Payne | Les échantillons étaient collectés à partir d'un pont qui surplombait l'étendue d'eau. Plusieurs maisons se retrouvaient à proximité du site de prélèvement. De plus, beaucoup de terres entourant la rivière Payne étaient utilisées pour le pâturage (fermes laitières et bovines), mais on retrouvait aussi beaucoup de terres recouvertes par la végétation. Ce qui différenciait ce site des autres c'est la quantité relativement élevée de terres humides. |
| MST-8 | Rivière South Nation | Les échantillons étaient collectés à partir d'un pont de la ville de St-Albert qui surplombait l'étendue d'eau. Le bassin était entouré de maisons et d'édifices commerciaux. La rivière Payne se situe à 1,7 km du site et l'étang d'épuration de la ville de St-Albert se situe à 2,6 km. Il était possible que la communauté de Crysler qu'on retrouve à 4,7 km en amont du site de prélèvement fût responsable d'une portion de la contamination fécale, car elle utilisait un système septique défectueux. Plusieurs fermes laitières situées à 1 et 4 km en amont pouvaient aussi participer à la contamination de l'eau. Aucune application de fumier n'avait été observée durant l'analyse des sites, mais quelques troupeaux de bernaches avaient adopté le bassin. |
| MST-9 | Crique Butternut | Les échantillons étaient collectés à partir d'un pont qui surplombait l'étendue d'eau. De l'épandage de fumier solide et liquide a été observé ainsi que plusieurs troupeaux de bernaches. Les terres qui entouraient le bassin de la crique Butternut servaient à une variété d'activités agricoles (culture de maïs, culture de fèves de soya, fermes laitières [forte concentration à 2,5 km], écurie et ferme avicole [2 km]). De plus, à 2 km du site se retrouvaient une large étendue marécageuse et beaucoup de végétation. |
| MST-18 | Site de drainage Blanchard servant au projet EPBH[a], route 700 | Les échantillons étaient collectés à la sortie d'un caniveau. La région immédiatement en amont était surtout entourée d'arbre et de terres servant à la culture de maïs et de fèves de soya. La partie supérieure du bassin était utilisée pour la culture de nourriture pour le bétail. Les terres cultivées étaient adjacentes à des fermes laitières, il était donc possible de croire que de l'épandage de fumier se faisait au courant de l'automne. Il était évident que des activités de pâturages étaient en cours dans la partie supérieure de l'aire de drainage. |

| | | |
|---|---|---|
| MST-19 | Site de drainage Blanchard servant au projet EPBH, route Laflèche | En amont de ce site se retrouvaient des terres servant à la culture de maïs et de fèves de soya et la partie supérieure du bassin servait aussi à ces cultures en plus de la culture de nourriture pour le bétail. Les terres cultivées étaient adjacentes à des fermes laitières, il était donc possible de croire que de l'épandage de fumier se faisait au courant de l'automne. L'aire entourant le bassin de drainage pouvait être considérée entièrement utilisée pour l'agriculture. Un seul troupeau de bernache a été aperçu pendant l'analyse des sites dans le sud de l'aire de drainage. |
| MST-20 | Site de drainage Bisaillon servant au projet EPBH, route Guerin | Les échantillons étaient collectés au drain de Bisaillon à la route Guerin. Les terres adjacentes au site de prélèvement étaient utilisées pour la culture de maïs. De plus, en amont du site il y avait une ferme laitière qui pratiquait le stockage des eaux usées et des activités de pâturage. Près de la ferme laitière et dans la partie supérieure du bassin, il y avait des terres servant à la culture de maïs, de petits grains et de fèves de soya. Plusieurs maisons sur la route 800 ainsi que plusieurs troupeaux de bernaches observés dans les environs auraient pu participer à la contamination de l'eau. |
| MST-21 | Site de drainage Bisaillon servant au projet EPBH, route Laflèche | Les échantillons étaient collectés au drain de Bisaillon à la route Laflèche. Les terres adjacentes au site de prélèvement étaient utilisées pour la culture de maïs, de fèves de soya et de fourrages en rotation. De plus, juste à côté du site il y avait aussi une ferme laitière qui pratiquait le stockage des eaux usées et des activités de pâturage. Dans la partie supérieure de l'aire de drainage, il y avait aussi des terres agricoles servant à la culture des mêmes végétaux susmentionnés. Plusieurs maisons sur la route 800 ainsi que plusieurs troupeaux de bernaches observés dans les environs ont pu participer à la contamination de l'eau. |
| MST-22 | Site servant au projet EPBH, accès des bovins restreint | Ce site se trouvait en aval du site 18. Au Nord du site il y avait des terres pour la culture du foin et du maïs. En amont il y avait des terres servant à la culture mixte de maïs et de fèves de soya. La partie supérieure de l'aire de drainage servait aussi à la culture, mais les terres adjacentes étaient occupées par une ferme laitière, il était donc possible de croire que de l'épandage de fumier se faisait au courant de l'automne. Il était évident que des activités de pâturages étaient en cours dans la partie supérieure de l'aire de drainage. |
| MST-24 | Site vierge dans la forêt Larose | Le site MST-24 servait de site contrôle comme il n'était pas supposé être influencé par des fermes, des édifices commerciaux ou des résidences. Il s'agissait d'un site complètement entouré de végétation. Les échantillons étaient recueillis à la sortie d'un caniveau. L'aire de drainage était entourée d'arbres (surtout des conifères) et de marécages. La pente au site de prélèvement était plutôt abrupte. La forêt Larose était auparavant utilisée comme terre agricole, mais dans les années 1920, par souci de conservation, cette aire a été changée en forêt artificielle. |

[a]Évaluation des pratiques de gestion bénéfiques à l'échelle des bassins hydrographiques. MST : «microbial source tracking»

## 3.3 La quantification de *Campylobacter* spp. par la méthode d'ensemencement direct (2010)

La méthode d'ensemencement direct (DP) a été utilisée en 2010 afin de confirmer l'efficacité de la technique de NPP, mais aussi pour tester de façon rapide, différents milieux de culture afin d'apporter des changements à la technique NPP si nécessaire. Pour cette méthode,

un volume de 500 mL a été préfiltré sur préfiltre de fibre de verre d'une porosité de 0,7 µm (Whatman) puis filtré sur un filtre d'ester de cellulose mixte de 0,22 µm (Pall, Canada). Puis, la biomasse du préfiltre et du filtre a été dispersée dans 10 mL d'eau tamponnée au phosphate (PBW; 42,5 mg/L de $KH_2PO_4$, 0,42 g/L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; (Eaton *et al.*, 2005)) à l'aide du vortex pour déloger les cellules des filtres. Les filtres ont été retirés du tube à l'aide de pince stérilisée à l'éthanol 80% et la flamme et les tubes ont été centrifugés pour 10 minutes à 14 600 *g* à 4°C. Un volume de 1 mL a été gardé du surnageant afin de disperser le culot. Ensuite, 10 µL et 100 µL du culot dispersé de chaque site a été déposé sur du milieu solide modifié LINE (43 g/L bouillon brucella (VWR International), 3 g/L extrait de levure (Fisher Scientific), 15 g/L agar, 1 g/L acide alpha-kétoglutarique et 600 mg/L carbonate de sodium (Line, 2001)), de l'agar Abeyta-Hunt-Bark additionnée de TTC (AHB; 40 g/L bouillon infusion cœur (Oxoid), 2 g/L extrait de levure (Fisher Scientific), 15 g/L agar, 32 mg/L cefopérazone, 10 mg/L rifampicine, 2 mg/L amphotéricine B, 100 mg/L chlorure de triphényltétrazolium, 250 mg/L pyruvate de sodium, 250 mg/L sulfate ferreux et 250 mg/L métabisulfite de sodium (Bridson, 1998)), du Karmali (Oxoid) (Karmali *et al.*, 1986) et du milieu solide sélectif pour *Campylobacter* sans-sang (mCCDA; 45,5 g/L agar sans-sang sélectif pour *Campylobacter* (Oxoid), 32 mg/L cefopérazone, 10 mg/L amphotéricine B (Bolton *et al.*, 1984)). Puis, les géloses ont été incubées dans des conditions microaérophiles à 42°C. Les colonies ont ensuite été repiquées après deux et six jours sur le même milieu que celui ayant servi à l'isolement (voir Fig. 3.2).

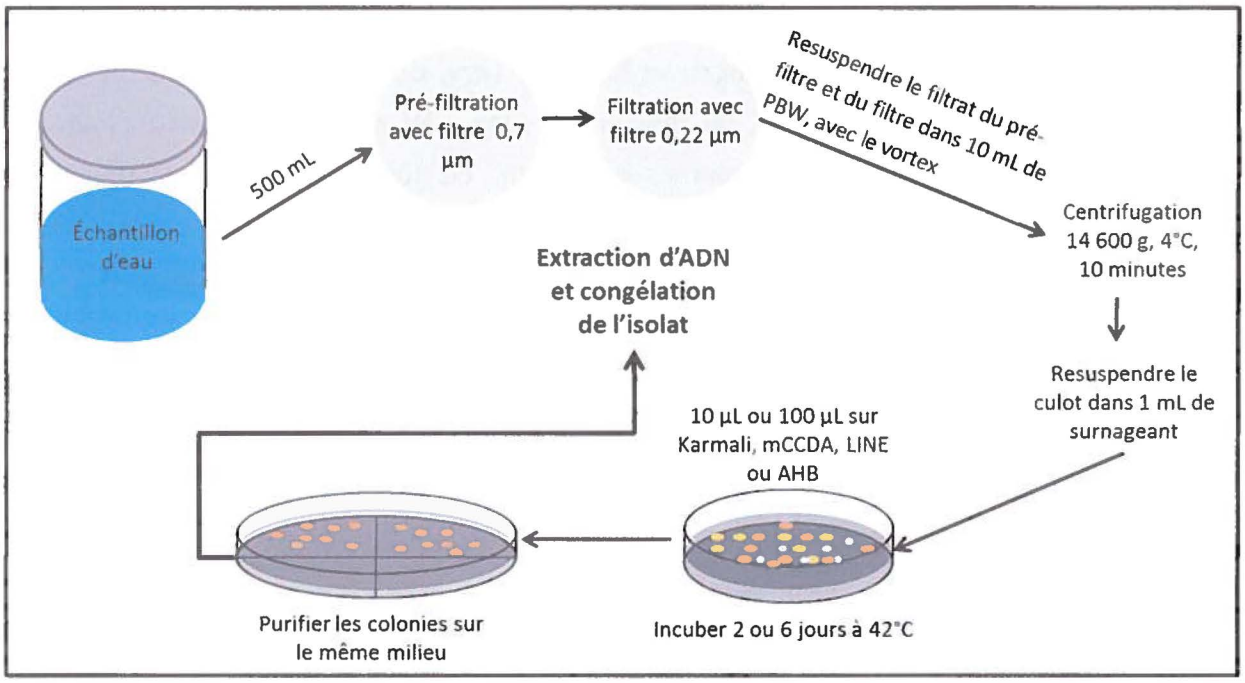


**Figure 3.2 : Schématisation du protocole d'ensemencement direct (DP) pour la quantification de *Campylobacter* spp. à partir des échantillons d'eau du bassin versant de la rivière South Nation.**

mCCDA : milieu solide sélectif pour *Campylobacter* sans-sang; LINE : milieu solide modifié LINE; AHB : milieu solide Abeyta-Hunt-Bark.

## 3.4 La quantification de *Campylobacter* spp. par la méthode du nombre le plus probable

La quantification s'est faite à l'aide d'un protocole du nombre le plus probable (NPP) qui consistait à l'analyse d'un aliquote de 500 mL, de cinq aliquotes de 100 mL et de cinq aliquotes de 10 mL par site. La méthode NPP permet de trouver une concentration approximative de cellules vivantes dans des échantillons selon les résultats de présence/absence obtenus à partir des 11 aliquotes. Ce test suppose que les cellules sont réparties de façon uniforme dans l'échantillon d'eau et qu'il n'y a aucune perte de cellules vivantes lors des analyses. Donc, le nombre de cellules cultivables de *Campylobacter* spp. contenu dans les différents aliquotes est supposé être distribué selon la loi de Poisson. Pour les échantillons de 500 mL et de 100 mL, la technique a débuté par la préfiltration de ces volumes sur un préfiltre de fibre de verre d'une porosité de 0,7 µm (Whatman) et la filtration subséquente sur des filtres d'ester de cellulose mixte de 0,22 µm (Pall, Canada). Les préfiltres et les filtres correspondant au même volume du même site ont été alors déposés dans un tube contenant 15 mL de bouillon Preston modifié (mPB; bouillon nutritif #2, Oxoid CM0067; 5000 U/L polymyxine B; 10 mg/L rifampicine; 10 mg/L

triméthoprime; 10 mg/L amphotéricine B; 125 mg/L pyruvate de sodium; 125 mg/L sulfate ferreux; 125 mg/L métabisulfite de sodium et 50 mL/L sang de cheval laqué (Bolton *et al.*, 1982b)). De plus, un volume de 50 mL de chacun des sites a été centrifugé pour 10 minutes à 14 600 *g* (4°C). Les culots ont été dispersés dans 1 mL du surnageant et ce volume a été séparé de façon égale entre 5 tubes contenant 15 mL de mPB. Ces derniers tubes représentaient les cinq échantillons de 10 mL nécessaires pour compléter l'analyse de NPP. Ils étaient traités ainsi, car 10 mL est un volume insuffisant pour utiliser la méthode de filtration.

Tous les tubes de mPB ont été ensuite incubés à 30 °C pour 3 h, puis à 37 °C pour 2 h et à 42 °C pour 43 h pour un total de 48 heures d'incubation. L'augmentation progressive de la température lors de l'incubation permet la ressuscitation des cellules endommagées (Corry *et al.*, 1995; Lévesque *et al.*, 2011). Après cette période, les tubes ont été mélangés à l'aide d'un vortex pour 10 secondes puis 10 µL de chaque tube a été ensemencé sur une gélose d'agar Karmali en se servant d'une boucle d'anse pleine et incubée pour 24 heures sous des conditions microaérophiles à 42°C. Par la suite, les plaques d'agar ont été examinées afin de trouver de la croissance ou des colonies isolées, puis deux colonies par morphologie observée ont été purifiées sur d'autres géloses de Karmali et incubées pour trois jours, dans les conditions précédemment énumérées. S'il n'y avait pas de croissance sur les premières géloses de Karmali, l'incubation était prolongée pour trois autres journées afin de récupérer les *Campylobacter* qui auraient pu avoir une croissance plus lente, puis les colonies ont été soumises au même traitement que les autres (Fig. 3.3).

Afin d'obtenir le résultat en *Campylobacter* NPP par 100 mL, il fallait tout d'abord caractériser chacune des colonies purifiées au niveau du genre et de l'espèce. Lorsqu'au moins une colonie isolée d'un tube était identifiée comme *Campylobacter* on considérait le tube comme positif. Puis avec le logiciel «MPN calculator», on identifiait le nombre de tube positif par site sur les 11 testés et cela donnait un résultat NPP (Fig. 3.4). Ce logiciel peut être téléchargé gratuitement à partir du lien suivant http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn/ et il très facile d'utilisation. Les résultats obtenus à l'aide du « MPN calculator » ont dû être multipliés par 100 afin d'obtenir le NPP/100 mL. Avec cette méthode il n'était pas nécessaire de compter les colonies sur les Pétris. De plus, les dilutions et le nombre de tubes pour chacune de ces dilutions permettent de détecter entre 0,096 et 16 NPP/100 mL.

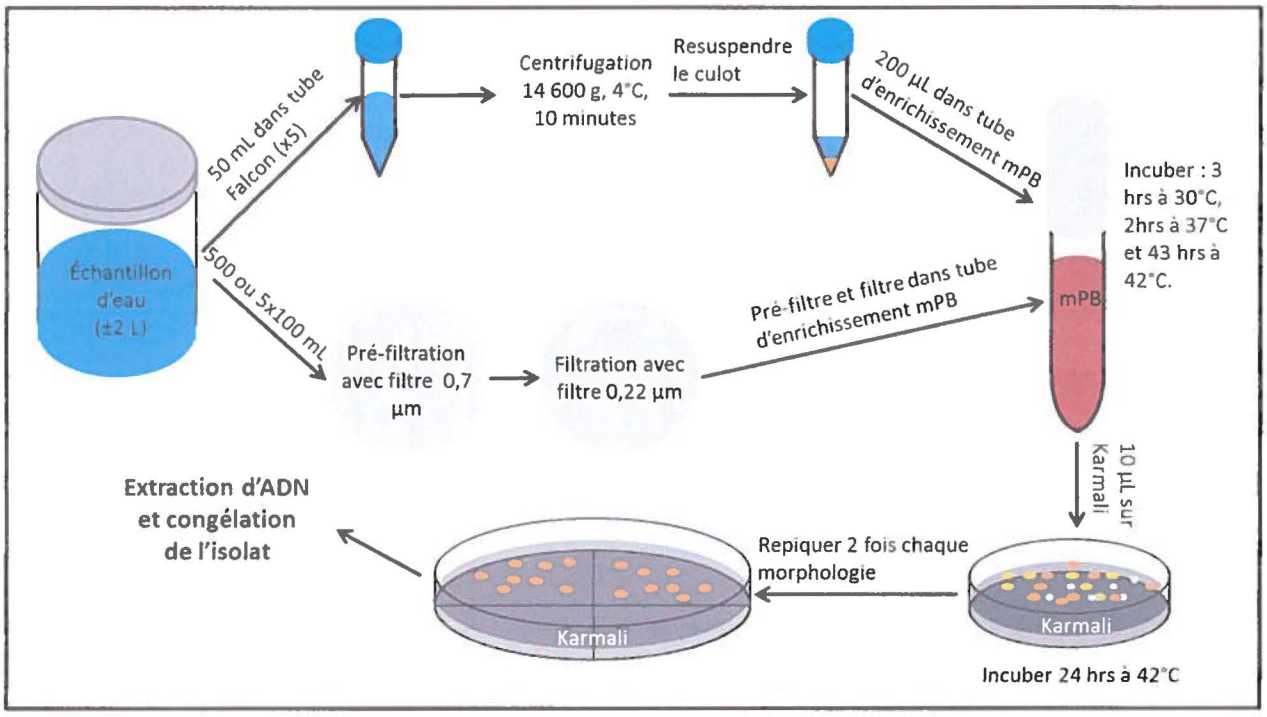


**Figure 3.3 : Schématisation du protocole nombre le plus probable (NPP) pour la quantification de *Campylobacter* spp. à partir des échantillons d'eau du bassin versant de la rivière South Nation**

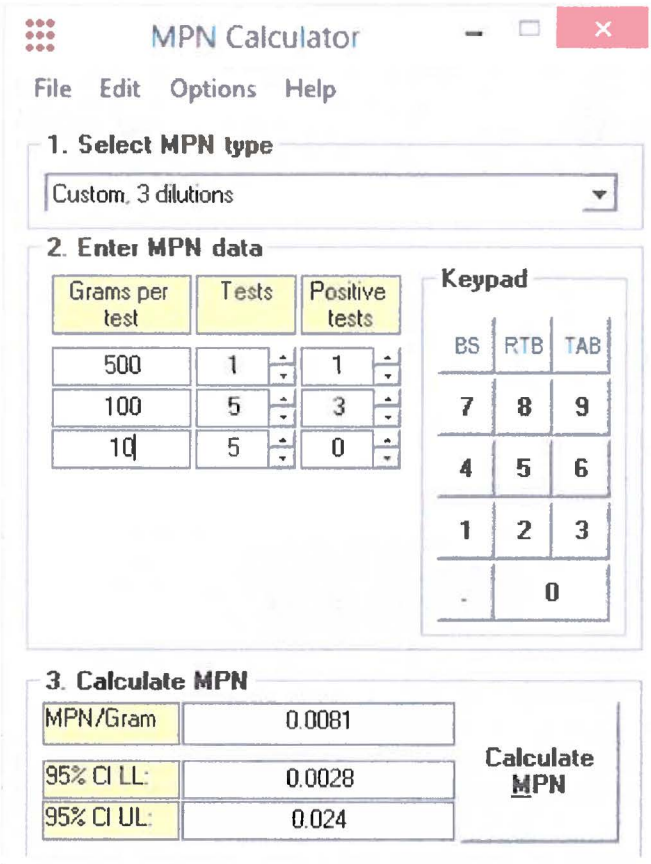


**Figure 3.4 : Utilisation du logiciel MPN calculator avec les paramètres un test de 500 mL, cinq tests de 100 mL et cinq tests de 10 mL.**

MPN : «most propable number»; CI LL : intervalle de confiance de la limite inférieure; CI UL : intervalle de confiance de la limite supérieure.

## 3.5 Technique moléculaire de caractérisation des isolats au niveau du genre et de l'espèce

L'ADN de tous les isolats a été extrait en incubant à 100 °C les colonies isolées dans 100 µL d'eau stérile pendant 10 minutes. L'ADN a ensuite été dilué 1:10 dans de l'eau ultrapure et conservé à -20 °C jusqu'à l'utilisation. Tous les ADN (isolats et souches références) ont été soumis à une PCR avec les amorces universelles pA/pH ciblant le gène de l'ARN ribosomal 16S (Bruce *et al.*, 1992) afin d'évaluer la présence et la qualité de l'ADN. Ensuite, une PCR utilisant les amorces C412F/C1288R a permis d'identifier au niveau du genre les isolats *Campylobacter* (Kreader, 1996; Linton *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2004). Pour ces PCR, une étape initiale de dénaturation pour 5 minutes à 94 °C et une étape finale d'élongation de 10

minutes ont été utilisées. Les autres conditions de PCR pour les amorces universelles et la détection du genre *Campylobacter* sont décrites dans le tableau 3.2.

Comme trois espèces thermophiles étaient à l'étude, l'utilisation de PCR multiplex (mPCR) a été de mise pour diminuer les coûts de caractérisation des isolats au niveau de l'espèce. L'optimisation d'une mPCR a été réussie en utilisant les souches références énumérées plus haut et les amorces hipO-F/hipO-R et ask-F/ask-R ciblant le gène de l'hippuricase hydrolase (*hipO*) de *C. jejuni* et le gène de l'aspartate kinase de *C. coli*, respectivement (Hani *et al.*, 1995; Slater *et al.*, 1997; Volokhov *et al.*, 2003; Steele *et al.*, 2006; Caner *et al.*, 2008; Talukder *et al.*, 2008; da Silva Quetz *et al.*, 2010). Malheureusement pour la détection de *C. lari,* il a été impossible d'inclure les amorces dans la mPCR, car la longueur du fragment amplifié (180 pb) était trop près de celui du gène *hipO* de *C. jejuni* (176 pb) et donc impossible de les différencier par électrophorèse sur gel d'agarose. Une PCR simplex a été donc nécessaire pour la détection de *C. lari* à l'aide des amorces JH0015/JH0016 qui ciblent le gène de maintenance *cpn60* (Chaban *et al.*, 2009). Pour ces PCR, une étape initiale de dénaturation de 5 minutes à 94 °C et une étape finale d'élongation de 10 minutes ont été utilisées. Les autres conditions de PCR pour la caractérisation des isolats au niveau de l'espèce sont décrites dans le tableau 3.2.

**Tableau 3.2 : Conditions de PCR avec les amorces universelles et pour la caractérisation au niveau du genre et de l'espèce des isolats**

| Organisme cible | Gène cible | Nom des amorces | Séquence des amorces (5'→3') | Programme (x nombre de cycles) | Longueur de l'ampicon (pb) | Référence |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Bactéries | ARNr 16S | pA | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 40 s à 94 °C, 1 min à 55 °C, 2 min à 72 °C (x30) | 1 500 | (Bruce *et al.*, 1992) |
| | | pH | AAGGAGGTGATCCAGCCGCA | | | |
| *Campylobacter* spp. | ARNr 16S | C412F | GGATGACACTTTTCGGAG C | 1 min à 94 °C, 1 min à 55 °C, 1 min à 72 °C (x30) | 816 | (Linton *et al.*, 1996) |
| | | C1288R | CAT TGTAGCACGTGTGTC | | | |
| *C. jejuni* | *hipO* | hipO-F | ATGATGGCTTCTTCGGATAG | 30 s à 95 °C, 30 s à 51 °C, 45 s à 72 °C (x35) | 176 | (da Silva Quetz *et al.*, 2010) |
| | | hipO-R | GCTCCTATGCTTACAACTGC | | | |
| *C. coli* | *ask* | ask-F | GGTATGATTTCTACAAGCGAG | | 502 | |
| | | ask-R | ATAAAAGACTATCGTCGCGTG | | | |
| *C. lari* | *Cpn60* | JH0015 | TCTGCAAATTCAGATGAGAAAA | 15 s à 95 °C, 15 s à 54 °C, 15 s à 72 °C (x40) | 180 | (Chaban *et al.*, 2009) |
| | | JH0016 | TTTTTCAGTATTTGTAATGAAATATGG | | | |

Toutes les PCR décrites antérieurement ont été effectuées dans un volume final de 25 µL et avec 10 µL d'ADN dilué 1:10 et en présence de tampon composé de 80 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,1% Triton X-100, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$, 2 mM $mgCl_2$, 0,2 mM de chaque dNTPs et de l'eau ultrapure. De plus, la concentration finale de chaque amorce était de 0,4 µM et la Taq polymérase a été ajoutée à une concentration finale de 0,6 U. Par la suite, le volume a été ajusté à 25 µL en ajoutant la quantité adéquate d'eau ultrapure et dans les témoins négatifs 10 µL d'eau ultrapure remplaçait l'ADN. L'amplification s'est faite à l'aide du thermocycler Eppendorf pro gradient (Thermo Fisher Scientific). Les amplicons ont été ensuite séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1,5% p/v avec 1x de tampon Tris-acétate-EDTA (TAE) à 120 V pour 1 heure. La détection des amplicons sur gel s'est poursuivie en colorant le gel en le submergeant dans une solution de bromure d'éthidium pour 30 minutes et en utilisant l'appareil Alpha Imager system de Thermo Fisher Scientific équipé du DE500 Darkroom.

## 3.6 Optimisation d'une méthode mPCR pour la détection des gènes de virulence, de production de cytotoxines et de résistance à la tétracycline

Les techniques de DP et de NPP ont permis d'isoler un très grand nombre d'isolats. Afin d'approfondir la caractérisation et de connaître un peu plus les dangers des souches aquatiques, des protocoles de détection des gènes de virulence, de production de cytotoxines et le gène *tet(O)* responsable de la résistance à la tétracycline ont été utilisés. Vu le grand nombre d'isolats et le temps restreints pour l'analyse, des protocoles de mPCR ont été développés en utilisant l'application SciTools OligoAnalyzer 3.1 (IDT technologies) afin d'éviter les dimères et les interactions entre les amorces. Lors des analyses de dimère d'amorces (hétéro-dimère) un résultat supérieur à -9 kcal/mole était considéré adéquat. De plus, la taille des fragments a été considérée afin de pouvoir distinguer les différents amplicons par électrophorèse. Il a fallu également que les amorces aient des températures d'hybridation similaires afin d'être couplées ensemble dans la même mPCR.

L'optimisation s'est faite avec les souches de références mentionnées précédemment et en exploitant différents paramètres comme l'ajout de BSA, de DMSO et de cycles supplémentaires. Cinq nouveaux protocoles permettant de détecter sept gènes de virulence (*flaA*, *flaB*, *racR*, *dnaK*, *ciaB*, *pldA* et *cj0588*), quatre gènes de production de cytotoxines (*cdtABC*, *cdtA*, *cdtB* et *cdtC*) ainsi que le gène conférant la résistance à la tétracycline *tet(O)* ont été développés grâce à cette stratégie. Les différentes conditions de PCR sont données dans le tableau 3.3.

**Tableau 3.3 : Conditions de mPCR pour la détection des gènes de virulence, de production de cytotoxines et du gène de résistance à la tétracycline *tet(O)* chez *C. jejuni***

| Gène cible | Nom des amorces | Séquence des amorces (5'→3') | Programme | Longueur de l'ampicon (pb) | Référence |
|---|---|---|---|---|---|
| *cdtA* | DS-18 | CCTTGTGATGCAAGCAATC | 2 min à 95°C<br>35x(30 s à 95°C, 30 s à 50°C,<br>1 min à 72°C),<br>5 min à 72°C[a]. | 370 | (Datta *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2004) |
| | DS-15 | ACACTCCATTTGCTTTCTG | | | |
| *tet(O)* | Tet(O)-F | GGCGTTTTGTTTATGTGCG | | 559 | (Hickey *et al.*, 2000) |
| | Tet(O)-R | ATGGACAACCCGACAGAAGC | | | |
| *cdtABC* | cdtABC-F | GAATTGGATTTGGGGCTATACT | 4 min à 94°C<br>30x(1 min à 94°C, 1 min à 42°C,1 min 30 s à 72°C),<br>5 min à 72°C[a]. | 1215 | (Krutkiewicz *et al.*, 2010) |
| | cdtABC-R | TTGCACATAACCAAAAGGAAG | | | |
| *cj0588* | cj0588-F(588E) | ATGAGATTTGATTTTTTTGTTTCA | | 770 | (Krutkiewicz *et al.*, 2010) |
| | Cj0588-R(588S) | ATTTTTGATATAGTAGTAAA | | | |
| *ciaB* | ciaB-652 | TGCGAGATTTTTCGAGAATG | 4 min à 94°C<br>30x(1 min à 94°C, 1 min à 58°C,1 min à 72°C),<br>5 min à 72°C. | 527 | (Zheng *et al.*, 2006) |
| | ciaB-1159 | TGCCCGCCTTAGAACTTACA | | | |
| *pldA* | pldA-361 | AAGAGTGAGGCGAAATTCCA | | 385 | (Zheng *et al.*, 2006) |
| | pldA-726 | GCAAGATGGCAGGATTATCA | | | |
| *cdtB* | cdtB-113 | CAGAAAGCAAATGGAGTGTT | | 620 | (Datta *et al.*, 2003) |
| | cdtB-713 | AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT | | | |
| *flaA* | flaA664 | AATAAAAATGCTGATAAAACAGGTG | 4 min à 94°C<br>35x(1 min à 94°C, 1 min à 53°C,1 min à 72°C),<br>7 min à 72°C[b]. | 855 | (Datta *et al.*, 2003) |
| | flaA1494 | TACCGAACCAATGTCTGCTCTGATT | | | |
| *flaB* | flaB-F(RAA9) | AAGGATTTAAAATGGGTTTTAGAATAAA CACC | | 260 | (Goon *et al.*, 2003) |
| | flaB-R(flaAB-B253) | GCTCATCCATAGCTTTATCTGC | | | |
| *racR* | racR-25 | GATGATCCTGACTTTG | 4 min à 94°C<br>35x(1 min à 94°C, 1 min à 46°C,1 min à 72°C),<br>5 min à 72°C[a]. | 584 | (Datta *et al.*, 2003) |
| | racR-593 | TCTCCTATTTTTACCC | | | |
| *dnaJ* | dnaJ-299 | AAGGCTTTGCTCATC | | 720 | (Datta *et al.*, 2003) |
| | dnaJ-1003 | CTTTTTGTTCATCGTT | | | |
| *cdtC* | cdtC-192 | CGATGAGTTAAAACAAAAAGATA | | 182 | (Datta *et al.*, 2003) |
| | cdtC-351 | TTGGCATTATAGAAAATACAGTT | | | |

[a]Ajout de albumine de sérum bovin (BSA) à une concentration finale de 0,15 µg/µL
[b]Ajout de diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration finale de 5%

## 3.7 Application des protocoles de mPCR pour la détection des gènes de virulence, de production de cytotoxines et de résistance à la tétracycline

L'ADN des isolats dilué 1:10 et extrait avec la technique décrite plus haut a été disposé dans des plaques 96 puits puis soumis aux cinq différents protocoles de mPCR (voir la section 3.5). Les souches de références ont aussi été incluses dans ces plaques de 96 puits afin d'avoir des témoins positifs et l'eau ultrapure constituait le témoin négatif pour chaque mPCR.

## 3.8 Séquençage des gènes de virulence, des gènes de production de cytotoxines et du gène de résistance à la tétracycline

Afin de vérifier que la spécificité des amorces permettant la détection des gènes de virulence, des gènes de production de cytotoxines et du gène de résistance à la tétracycline, les amplicons ont été séquencés. Le protocole a utilisé la polymérase Taq titanium et a permis d'éviter l'étape de la purification de l'ADN après la première amplification. De plus, cette enzyme fait moins d'erreurs. Pour les amplicons qui devaient être séquencés, une PCR simplex a été fait en utilisant les mêmes programmes retrouvés au tableau 3.3 en plus d'employer les réactifs nécessaires pour le séquençage avec la Taq titanium (voir tableau 3.4). Les fragments envoyés au séquençage provenaient tous de *C. jejuni* du réservoir de la rivière South Nation ayant eu des résultats positifs pour le gène qui devaient être séquencé ainsi que certaines souches références (*C. jejuni* ATCC 29428, *C. fetus* spp. *fetus* ATCC 27374 et *C. jejuni* spp. *doylei* ATCC 49349.

**Tableau 3.4 : Réactifs pour la PCR de séquençage avec la polymérase Taq titanium**

| Réactifs | Concentration finale désirée | Volume à ajouter dans une réaction de 15 µL |
|---|---|---|
| 10X tampon Titanium™ *Taq* | 1X | 1,5 µL |
| *(35 mM $MgCl_2$)* | (3,5 mM) | (inclus dans le tampon Titanium™ *Taq* 10X) |
| 2 mM dNTPs | 0,1 mM | 0,50 µL |
| 10 µM amorce sens | 0,08 µM | 0,12 µL |
| 10 µM amorce antisens | 0,08 µM | 0,12 µL |
| $H_2O$ HPLC stérile | Ajuster le volume à 15 µL | 2,66 µL |
| *Polymérase Titanium Taq* | 0,50X/10 µL | 0,10 µL |
| Total ADN conc. : 1 ng/µL | 0,1 ng/réaction | 10,00 µL |

Les amplicons ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose en utilisant les paramètres décrits dans la section 3.5. Si les résultats observés étaient satisfaisants, 1 µL de la réaction de PCR étaient mis en présence de 8,5 µL de mélange réactionnel (contiens 3,75 µL H2O stérile; 2,5 µL de tréhalose 20%; 1,75 µL de 5X tampon de séquençage et 0,5 µL de mélange Big Dye terminator) et 0,5 µL d'amorce (3,2 µM) sens ou antisens selon le cas, pour un volume final de 10 µL. Pour faire l'amplification, les tubes ont été soumis à un programme de 29 cycles : 94 °C pour 10 secondes, puis 50 °C pour 5 secondes et 60 °C pour 4 minutes, dans le Thermocycler Eppendorf pro gradient (Thermo Fisher Scientific). Après la dernière étape d'amplification, les amplicons ont été envoyés à l'unité de séquençage d'Agriculture et Agroalimentaire Canada qui utilise l'électrophorèse capillaire de ABI Prism 3130XL. Enfin, les séquences obtenues ont été analysées et assemblées en utilisant le logiciel SeqMan de la suite DNASTAR.

# 4 RÉSULTATS

## 4.1 La localisation des sites

En 2010, les sites d'échantillonnage situés dans le bassin versant de la rivière South Nation ont été choisis selon des résultats de tests présence/absence de *Campylobacter* spp. effectués en 2009. Ces analyses de présence/absence ont été effectuées toutes les deux semaines par le laboratoire du Dr. David Lapen. Les cinq sites à l'étude en 2010 (MST-5, MST-18, MST-19, MST-20 et MST-21) étaient les plus souvent contaminés. Les sites choisis avaient des résultats de présence/absence entre 43,1% et 57,4% et étaient donc considérés comme les plus fréquemment contaminés. Les tests de présence/absence se faisaient en filtrant 500 ml sur un filtre 0,45 µm et en plaçant ce filtre dans du bouillon Bolton dans des conditions microaérophiles (5% $O_2$, 10% $CO_2$ et 85% $N_2$) pendant 24 heures à 42°C. Puis, des géloses CCDA ont été ensemencées avec le bouillon Bolton et les géloses ont été incubées à 42°C pendant 48 heures dans les mêmes conditions microaérophiles (Jokinen *et al.*, 2010). Afin de confirmer qu'il s'agissait bien de *Campylobacter,* les colonies ont été testées avec une PCR multiplexe (Denis *et al.*, 1999). Cependant, il n'a pas été pris en considération la similarité entre les sites, le peu de paramètres différents, ainsi que leur proximité. De plus, les échantillons du site MST-24 qui devaient être utilisés comme témoin n'ont pas été inclus dans les analyses et malheureusement le site MST-1 n'a pas été analysé en 2009. En 2011 et 2012, le choix des sites s'est fait selon la concentration de *Campylobacter* spp., mais aussi la diversité des sites, leur éloignement ainsi que l'ajout du site témoin.

## 4.2 Comparaison de la méthode NPP et la méthode d'ensemencement direct pour la quantification de *Campylobacter* (2010)

La méthode NPP est en général une technique plus sensible pour la quantification de *Campylobacter* spp. dans les échantillons d'eau, car elle comprend une incubation dans un bouillon d'enrichissement ce qui permettrait aux bactéries qui se trouvaient dans un état VBNC de redevenir cultivables. En 2010, les deux méthodes NPP et d'ensemencement direct ont été utilisées en parallèle afin de confirmer que la méthode NPP était bien la technique qui

permettait de récupérer le plus de bactéries *Campylobacter*, et qu'elle était aussi plus sensible (voir figure 4.1). La technique NPP permettait de déceler *Campylobacter* dans plusieurs sites qui étaient négatifs avec la méthode d'ensemencement direct. De plus, la méthode d'ensemencement direct a été utilisée avec quatre milieux de culture différents afin de repérer le milieu le plus efficace et sélectif pour la récupération de *Campylobacter* spp. (voir figure 4.2 et tableau 4.1). Le milieu Karmali s'est avéré meilleur pour la récupération de bactéries dans le milieu. Il était possible d'obtenir un grand nombre de colonies sur ce milieu. Cependant, il n'était pas très sélectif (77,0 % d'inconnu), mais en le combinant à la méthode NPP le pourcentage d'inconnu diminuait à 2,0 %.

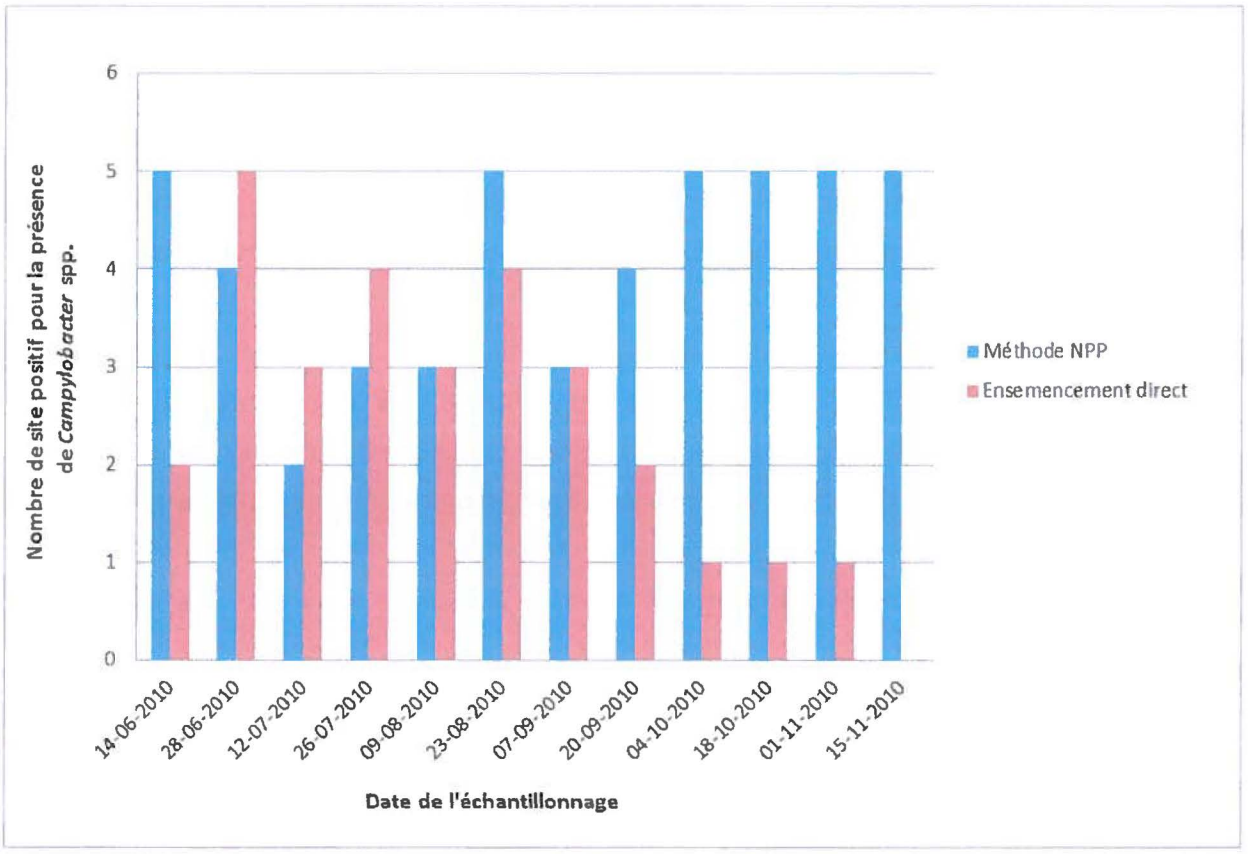


**Figure 4.1 : Comparaison entre la méthode du nombre le plus probable (NPP) et la technique d'ensemencement direct pour la récupération de *Campylobacter* spp. des échantillons d'eau obtenus des sites MST-5, MST-18, MST-19, MST-20 et MST-21 en 2010.**

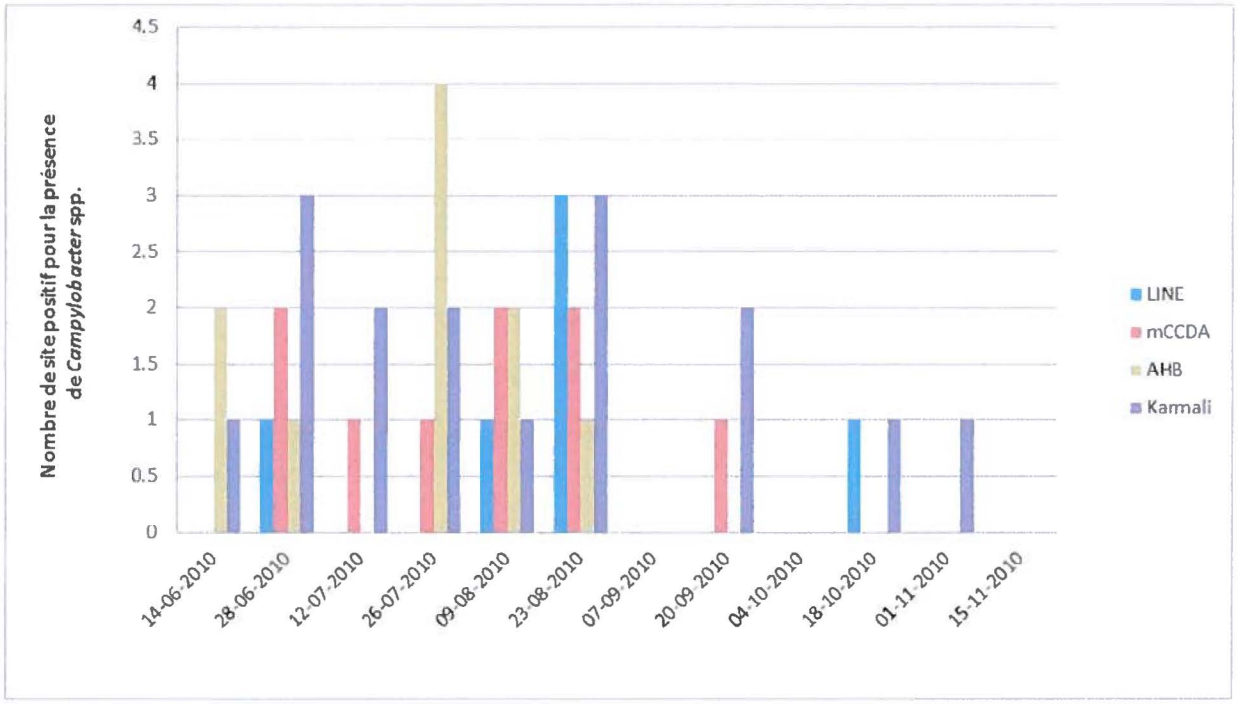


**Figure 4.2 : Comparaison entre différents milieux de culture utilisés avec la technique d'ensemencement direct pour la récupération de *Campylobacter* spp en 2010.**

mCCDA : milieu solide sélectif pour *Campylobacter* sans-sang; LINE : milieu solide modifié LINE; AHB : milieu solide Abeyta-Hunt-Bark.

**Tableau 4.1 : Nombre d'isolats obtenus avec les différents milieux et techniques ainsi que leur affiliation aux espèces *Campylobacter* avec les PCR décrites dans le tableau 3.2**

| Milieu de culture (méthode) | No. d'isolats | [a]*Campylobacter* sp. | *C. coli* | *C. jejuni* | *C. lari* | [b]Inconnu |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| AHB (DP) | 61 | 1 (1,6) | 2 (3,3) | 9 (14,8) | 7 (11,5) | 42 (68,9) |
| Karmali (DP) | 148 | 11 (7,4) | 8 (5,4) | 12 (8,1) | 3 (2,0) | 114 (77,0) |
| LINE (DP) | 50 | 1 (2,0) | 9 (18,0) | 9 (18,0) | 1 (2,0) | 30 (60,0) |
| mCCDA (DP) | 59 | 0 (0,0) | 8 (13,6) | 5 (8,5) | 7 (11,9) | 39 (66,1) |
| Karmali (NPP) | 748 | 16 (2,1) | 14 (1,9) | 699 (93,4) | 4 (0,5) | 15 (2,0) |

[a]L'analyse n'a pas permis une affiliation précise à une espèce. [b]Isolat non identifié comme *Campylobacter* au niveau du genre ou de l'espèce. DP : ensemencement direct; NPP : nombre le plus probable; mCCDA : milieu solide sélectif pour *Campylobacter* sans-sang; LINE : milieu solide modifié LINE; AHB : milieu solide Abeyta-Hunt-Bark.

## 4.3 Caractérisation au niveau du genre et de l'espèce des isolats obtenus (2010-2012)

À l'aide de la technique NPP et de la méthode DP, en 2010, il a été possible d'isoler plus d'un millier de *Campylobacter* aquatiques du bassin versant de la rivière South Nation. Ces isolats devaient être caractérisés afin de connaître l'espèce dominante dans ce bassin versant et pour poursuivre les recherches au niveau des gènes de virulence, des gènes de production de cytotoxines et du gène de la résistance à la tétracycline (voir tableau 4.2). Afin d'observer des changements au niveau des espèces dominantes ou de la concentration de *Campylobacter* dans l'eau, la caractérisation au niveau du genre et de l'espèce s'est poursuivie en 2011-2012 (tableaux 4.3 et 4.4). Une PCR sur l'ARNr 16S de chacun des isolats a permis de déterminer si l'ADN avait été correctement extrait. Puis les isolats ont été soumis à une PCR les caractérisant au niveau du genre avec les amorces C412F et C1288R et une PCR spécifique pour l'espèce *C. lari* avec les amorces JH0015 et JH0016 et une mPCR pour l'affiliation des isolats à l'espèce *C. coli* ou *C. jejuni* avec les amorces ask-F et ask-R et hipO-F et hipO-R respectivement (tableau 3.2). Les souches qui ont été affiliées au genre *Campylopacter*, mais qui n'ont pas pu être identifiées au niveau de l'espèce avec les PCR subséquentes sont décrites comme «*Campylobacter* sp.» dans les tableaux 4.2, 4.3 et 4.4. Certains ADN donnaient des résultats positifs à la PCR avec deux des trois espèces testées, ces résultats sont donc comptabilisés dans la colonne «non-pure 2/3 espèces» des tableaux 4.2, 4.3 et 4.4. De plus, d'autres échantillons d'ADN extrait des isolats environnementaux avaient de l'ADN amplifiable, car ils obtenaient une bande de 1500 paires de bases avec la PCR sur l'ARNr 16S, mais on n'obtenait aucun résultat positif avec les PCR subséquentes. Ces isolats appartiennent possiblement à un autre genre bactérien et sont identifiés dans les tableaux 4.2, 4.3 et 4.4 comme des inconnus.

Selon les résultats PCR effectués sur l'ADN des isolats aquatique, l'espèce dominante serait *C. jejuni*. En 2011 et 2012, la deuxième espèce dominante était *C. lari,* tandis qu'en 2010 la différence entre le nombre d'isolats *C. coli* et *C. lari* est beaucoup plus petite et il semble que le site MST-19 soit responsable de la plus grand majorité des isolats *C. coli*. En 2010, le site MST-19 a permis de récupérer le plus d'isolats et le plus de *Campylobacter*. De plus, ce site avait un très bas pourcentage d'inconnu (8,4%) tandis que le site MST-21 avait le plus haut (41,5 %). En 2011 et 2012, le site MST-9 avait permis de récupérer le plus de *Campylobacter* tandis que les sites MST-1, MST-8 et MST-22 étaient peu et plus rarement contaminés et donc moins d'isolats de ces sites ont été obtenus. Dans les deux dernières années de l'étude, très

peu d'isolats ont été décrits comme inconnu et presque la totalité des échantillons contenait de l'ADN amplifiable.

Les sites MST-5, MST-18 et MST-20 ont été analysés pendant les trois années de l'étude. Pour le site MST-5 on peut observer, à partir de 2011, une forte augmentation du nombre d'isolats *C. lari* récupéré, alors à ce site *C. lari* devient clairement la deuxième espèce la plus commune. Les sites MST-18 et MST-20 n'ont pas subi de changement majeur au niveau des espèces ou du nombre d'isolats récupéré.

**Tableau 4.2 : Affiliation des isolats aux *Campylobacter* obtenus en 2010 (NPP et DP)**

| Site no. | No. isolats | Isolats avec ADN amplifiable | [a]*Campylobacter* sp. | *C. coli* | *C. jejuni* | *C. lari* | [b]Non-pure 2/3 espèces | [c]Inconnu | Isolats avec ADN non-amplifiable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| MST-5 | 259 | 249 (96,1) | 6 (2,4) | 3 (1,2) | 184 (73,9) | 3 (1,2) | 3 (1,2) | 50 (20,1) | 10 (4,0) |
| MST-18 | 291 | 283 (97,3) | 16 (5,7) | 3 (1,1) | 174 (61,5) | 2 (0,7) | 3 (1,1) | 85 (30,0) | 8 (2,8) |
| MST-19 | 340 | 309 (90,9) | 3 (1,0) | 32 (10,4) | 209 (67,6) | 10 (3,2) | 29 (9,4) | 26 (8,4) | 31 (10,0) |
| MST-20 | 117 | 115 (98,3) | 2 (1,7) | 1 (0,9) | 92 (80,0) | 0 (0,0) | 2 (1,7) | 18 (15,7) | 2 (1,7) |
| MST-21 | 152 | 147 (96,7) | 2 (1,4) | 2 (1,4) | 75 (51,0) | 7 (4,8) | 0 (0,0) | 61 (41,5) | 5 (3,4) |
| Total | 1159 | 1103 (95,2) | 29 (2,6) | 41 (3,7) | 734 (66,5) | 22 (2,0) | 37 (3,4) | 240 (21,8) | 56 (5,1) |

[a]L'analyse n'a pas permis une affiliation précise à une espèce. [b]Affiliation à 2 espèces sur 3 par PCR, bandes multiples. [c]Isolats non-affilié au genre ou à l'espèce *Campylobacter* par PCR, résultat positif avec les amorces universelles.

**Tableau 4.3 : Affiliation des isolats aux *Campylobacter* obtenus en 2011 (NPP)**

| Site no. | No. isolats | Isolats avec ADN amplifiable | [a]*Campylobacter* sp. | *C. coli* | *C. jejuni* | *C. lari* | [b]Non-pure 2/3 espèces | [c]Inconnu | Isolats avec ADN non-amplifiable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| MST-1 | 14 | 14 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 14 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| MST-5 | 244 | 232 (95,1) | 1 (0,4) | 4 (1,7) | 191 (82,3) | 28 (12,1) | 8 (3,4) | 0 (0,0) | 12 (5,2) |
| MST-6 | 151 | 151 (100,0) | 0 (0,0) | 7 (4,6) | 86 (57,0) | 51 (33,8) | 7 (4,6) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| MST-8 | 65 | 65 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 39 (60,0) | 22 (33,8) | 4 (6,2) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| MST-9 | 328 | 325 (99,1) | 2 (0,6) | 33 (10,2) | 197 (60,6) | 72 (22,2) | 21 (6,5) | 1 (0,3) | 2 (0,6) |
| MST-18 | 119 | 113 (95,0) | 3 (2,7) | 4 (3,5) | 98 (86,7) | 4 (3,5) | 4 (3,5) | 6 (5,3) | 0 (0,0) |
| MST-20 | 84 | 80 (95,2) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 78 (97,5) | 2 (2,5) | 0 (0,0) | 2 (2,5) | 2 (2,5) |
| MST-22 | 38 | 35 (92,1) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 34 (97,1) | 0 (0,0) | 1 (2,9) | 0 (0,0) | 3 (8,6) |
| MST-24 | 52 | 52 (100,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 46 (88,5) | 4 (7,7) | 2 (3,8) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| Total | 1095 | 1067 (97,4) | 6 (0,6) | 48 (4,5) | 783 (73,4) | 183 (17,2) | 47 (4,4) | 9 (0,8) | 19 (1,8) |

[a]L'analyse n'a pas permis une affiliation précise à une espèce. [b]Affiliation à 2 espèces sur 3 par PCR, bandes multiples. [c]Isolats non-affilié au genre ou à l'espèce *Campylobacter* par PCR, résultat positif avec les amorces universelles.

**Tableau 4.4 : Affiliation des isolats aux *Campylobacter* obtenus en 2012 (NPP)**

| Site no. | No. isolats | Isolats avec ADN amplifiable | [a]*Campylobacter* sp. | *C. coli* | *C. jejuni* | *C. lari* | [b]Non-pure 2/3 espèces | [c]Inconnu | Isolats avec ADN non-amplifiable |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | n | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| MST-1 | 44 | 42 (95,5) | 3 (7,1) | 3 (7,1) | 24 (57,1) | 12 (28,6) | 0 (0,0) | 2 (4,8) | 0 (0,0) |
| MST-5 | 144 | 142 (98,6) | 6 (4,2) | 0 (0,0) | 100 (70,4) | 30 (21,1) | 6 (4,2) | 2 (1,4) | 0 (0,0) |
| MST-6 | 107 | 106 (99,1) | 5 (4,7) | 3 (2,8) | 84 (79,2) | 14 (13,2) | 1 (0,9) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| MST-8 | 38 | 38 (100,0) | 1 (2,6) | 1 (2,6) | 10 (26,3) | 22 (57,9) | 4 (10,5) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| MST-9 | 257 | 254 (98,8) | 6 (2,4) | 4 (1,6) | 164 (64,6) | 76 (29,9) | 4 (1,6) | 3 (1,2) | 0 (0,0) |
| MST-18 | 103 | 100 (97,1) | 0 (0,0) | 6 (6,0) | 76 (76,0) | 14 (14,0) | 4 (4,0) | 3 (3,0) | 0 (0,0) |
| MST-20 | 60 | 60 (100,0) | 1 (1,7) | 0 (0,0) | 57 (95,0) | 0 (0,0) | 2 (3,3) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| MST-22 | 55 | 55 (100,0) | 0 (0,0) | 11 (20,0) | 18 (32,7) | 26 (47,3) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| MST-24 | 73 | 73 (100,0) | 15 (20,5) | 7 (9,6) | 51 (69,9) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| Total | 881 | 870 (98,8) | 37 (4,3) | 35 (4,0) | 584 (67,1) | 194 (22,3) | 21 (2,4) | 10 (1,1) | 0 (0,0) |

[a]L'analyse n'a pas permis une affiliation précise à une espèce. [b]Affiliation à 2 espèces sur 3 par PCR, bandes multiples. [c]Isolats non-affilié au genre ou à l'espèce *Campylobacter* par PCR, résultat positif avec les amorces universelles.

## 4.4 Quantification de *Campylobacter* spp. pour tous les sites (2010-2012)

La quantification de *Campylobacter* spp., en 2010, a pu se faire de deux façons différentes, selon la technique choisie entre DP et NPP. La méthode DP a permis de quantifier le nombre d'unités formatrices de colonies (CFU) *Campylobacter* par 100 mL tandis que la seconde a permis de déterminer la concentration en NPP par 100 mL (voir tableau 4.5). En 2011 et 2012, grâce à la comparaison entre la méthode DP et NPP ainsi que la comparaison des milieux de culture, seule une technique a été nécessaire pour la quantification de *Campylobacter* spp. : la technique NPP avec le milieu de culture Karmali (voir tableau 4.6 et 4.7). De plus, la quantification a toujours été effectuée toutes les deux semaines du printemps à l'automne, sauf pour 2010 où l'échantillonnage a commencé durant l'été (juin). Enfin, pour obtenir les résultats de quantification en NPP/100 mL, il a été primordial d'obtenir tout d'abord les résultats des affiliations au niveau du genre et de l'espèce afin de bien confirmer l'identité des isolats.

En 2010, la quantification de *Campylobacter* spp. pour le site MST-19 a à huit reprises dépassé la limite supérieure de détection de 16 NPP/100 mL tandis que les autres sites l'ont seulement atteint à quatre reprises ou moins (tableau 4.5). Cela indiquait donc qu'il y avait une plus forte présence de *Campylobacter* au site MST-19. Cependant, aucun site n'a été sous la limite de détection inférieure qui était de 0,096 NPP/100 mL. Il y a eu une baisse dans la plupart des sites de la concentration de *Campylobacter* à la fin juillet et au début août. Des analyses statistiques pourraient permettre de bien refléter la tendance. Cette diminution de *Campylobacter* pourrait être due à des précipitations plus faibles ou d'autres facteurs physico-chimiques.

En 2011, la quantification au site MST-1 a seulement débuté le 2 août. Plusieurs des sites ont vu leur concentration en *Campylobacter* spp. sous la limite de détection inférieure. Peu de sites avaient une forte concentration de *Campylobacter* spp. Une certaine augmentation de *Campylobacter* a été observée à la fin mai/début juin, et une autre augmentation à l'automne. Ces périodes d'augmentation correspondraient avec l'épandage de fumier sur les terres agricoles. La concentration de *Campylobacter* au site MST-9 a dépassé à plusieurs reprises (cinq fois) la limite supérieure de détection (16 NPP/100 mL) (tableau 4.6). Cela pourrait être dû à la forte densité de terres agricoles, d'élevage et l'épandage confirmé de fumier solide et

liquide. Les sites MST-1, MST-8 et MST-24 avaient en général une faible concentration de *Campylobacter*. Le MST-1 sert de site de prélèvement de l'eau pour la communauté de Casselman et le site MST-24 n'est pas influencé par les activités agricoles, urbaines ou industrielles, car il est isolé dans la forêt Larose.

En 2012, le site MST-24 était toujours un des sites les moins contaminés avec 10 échantillonnages sous la limite inférieure de détection (tableau 4.7). Le site MST-9 a atteint moins souvent la limite supérieure de détection (deux fois en 2012 et cinq fois en 2011) ce qui suggère une baisse de la contamination, ce qui pourrait être attribuable à la baisse des précipitations, des caractéristiques physico-chimiques du site (température, pH, turbidité, conductivité, etc.) ou de l'épandage de fumier sur les terres agricoles. Il manque plusieurs échantillons pour les sites MST-18, MST-20 et MST-22, car les sites étaient souvent à sec. En 2012, entre les mois d'avril et septembre, la région d'Ottawa a reçu 424,4 mm de pluie comparés à 572,4 mm et 602,8 mm en 2011 et 2010 respectivement (données recueillies par Environnement Canada). Cette diminution des précipitations pourrait expliquer la baisse de concentration générale pour la plupart des sites. Pour la dernière année d'échantillonnage, il a été possible d'observer une augmentation pour quelques sites à la fin mai/début juin.

**Tableau 4.5 : Concentration en NPP/100 mL selon les dates et les sites d'échantillonnages de 2010.**

| Site | | Date jj-mm-aaaa | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 14-06-2010 | 28-06-2010 | 12-07-2010 | 26-07-2010 | 09-08-2010 | 23-08-2010 | 20-09-2010 | 04-10-2010 | 18-10-2010 | 01-11-2010 | 15-11-2010 |
| MST-5 | NPP/100mL | >16 | 1,7 | 9,2 | 9,2 | 1,3 | >16 | >16 | >16 | 5,4 | >16 | 5,4 |
| | 95% CI LL | 5,4 | 0,65 | 2,9 | 2,9 | 0,48 | 5,4 | 5,4 | 5,4 | 1,6 | 5,4 | 1,6 |
| | 95% CI UL | 48 | 4,6 | 29 | 29 | 3,5 | 48 | 48 | 48 | 18 | 48 | 18 |
| MST-18 | NPP/100mL | 2,4 | 2,8 | 1,8 | 0,1 | >16 | >16 | >16 | 9,2 | >16 | 9,2 | 5,4 |
| | 95% CI LL | 0,89 | 1 | 0,67 | 0,013 | 5,4 | 5,4 | 5,4 | 2,9 | 5,4 | 2,9 | 1,6 |
| | 95% CI UL | 6,4 | 7,6 | 4,7 | 0,78 | 48 | 48 | 48 | 29 | 48 | 29 | 18 |
| MST-19 | NPP/100mL | >16 | >16 | >16 | 0,81 | 1,4 | >16 | >16 | >16 | >16 | 9,2 | >16 |
| | 95% CI LL | 5,4 | 5,4 | 5,4 | 0,28 | 0,52 | 5,4 | 5,4 | 5,4 | 5,4 | 2,9 | 5,4 |
| | 95% CI UL | 48 | 48 | 48 | 2,4 | 3,8 | 48 | 48 | 48 | 48 | 29 | 48 |
| MST-20 | NPP/100mL | 0,81 | 0,93 | 4,3 | [a] | [a] | >16 | [a] | >16 | >16 | 2,2 | 3.5 |
| | 95% CI LL | 0,28 | 0,33 | 1,4 | | | 5,4 | | 5,4 | 5,4 | 0,83 | 0,046 |
| | 95% CI UL | 2,4 | 2,7 | 13 | | | 48 | | 48 | 48 | 5,9 | 10 |
| MST-21 | NPP/100mL | >16 | 1,3 | 0,46 | 2,5 | 4,3 | >16 | 0,34 | >16 | 1,3 | 2,2 | 0,21 |
| | 95% CI LL | 5,4 | 0,48 | 0,14 | 0,93 | 1,4 | 5,4 | 0,09 | 5,4 | 0,48 | 0,83 | 0,046 |
| | 95% CI UL | 48 | 3,5 | 1,5 | 6,8 | 13 | 48 | 1,3 | 48 | 3,5 | 5,9 | 0,97 |

Aucun échantillonnage le 07 septembre 2010. [a]Il arrive parfois que les sites soient secs, surtout lors de période estivale, donc les analyses ne sont pas possibles. NPP : nombre le plus probable; CI LL : intervalle de confiance de la limite inférieure; CI UL : intervalle de confiance de la limite supérieure.

**Tableau 4.6 : Concentration en NPP/100 mL selon les dates et les sites d'échantillonnages de 2011.**

| Site | | Date jj-mm-aaaa | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 12-04-2011 | 26-04-2011 | 09-05-2011 | 24-05-2011 | 06-06-2011 | 20-06-2011 | 04-07-2011 | 18-07-2011 | 02-08-2011 | 15-08-2011 | 29-08-2011 | 12-09-2011 | 26-09-2011 | 11-10-2011 | 24-10-2011 | 07-11-2011 | 21-11-2011 |
| MST-1 | NPP/100mL | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | <0,096 | <0,096 | <0,096 | [a] | <0,096 | <0,096 | 0,21 | 0,29 | 0,81 |
| | 95% CI LL | | | | | | | | | 0,012 | 0,012 | 0,012 | | 0,012 | 0,012 | 0,046 | 0,074 | 0,28 |
| | 95% CI UL | | | | | | | | | 0,78 | 0,78 | 0,78 | | 0,78 | 0,78 | 0,97 | 1,1 | 2,4 |
| MST-5 | NPP/100mL | 16 | 1,1 | 2,2 | >16 | 3,5 | 3,5 | 2,4 | 5,4 | 0,5 | 0,81 | 0,13 | 1,1 | 0,29 | <0,096 | 1,4 | <0,096 | 1 |
| | 95% CI LL | 5,4 | 0,39 | 0,83 | 5,4 | 1,2 | 1,2 | 0,89 | 1,6 | 0,15 | 0,28 | 0,02 | 0,39 | 0,074 | 0,012 | 0,52 | 0,012 | 0,36 |
| | 95% CI UL | 48 | 3 | 5,9 | 48 | 10 | 10 | 6,4 | 18 | 1,6 | 2,4 | 0,82 | 3 | 1,1 | 0,78 | 1,8 | 0,78 | 2,6 |
| MST-6 | NPP/100mL | <0,096 | >16 | 0,72 | 2,4 | 1,1 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | >16 | 1,1 | 1,1 | 0,1 | 0,29 | 3,5 | 2,8 | 16 |
| | 95% CI LL | 0,012 | 5,4 | 0,24 | 0,89 | 0,39 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 5,4 | 0,39 | 0,39 | 0,013 | 0,074 | 1,2 | 1 | 5,4 |
| | 95% CI UL | 0,78 | 48 | 2,2 | 6,4 | 3 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 48 | 3 | 3 | 0,78 | 1,1 | 1 | 7,6 | 48 |
| MST-8 | NPP/100mL | <0,096 | 3,5 | 0,34 | 1,7 | 1,7 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | [a] | <0,096 | 0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | 0,5 |
| | 95% CI LL | 0,012 | 1,2 | 0,09 | 0,65 | 0,65 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,15 |
| | 95% CI UL | 0,78 | 10 | 1,3 | 4,6 | 4,6 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 1,6 |
| MST-9 | NPP/100mL | <0,096 | 9,2 | 2,4 | 3,5 | >16 | >16 | 0,5 | >16 | <0,096 | 5,4 | 4,3 | 16 | >16 | 0,29 | >16 | 3,5 | 0,81 |
| | 95% CI LL | 0,012 | 2,9 | 0,89 | 1,2 | 5,4 | 5,4 | 0,15 | 5,4 | 0,012 | 1,6 | 1,4 | 5,4 | 5,4 | 0,074 | 5,4 | 1,2 | 0,28 |
| | 95% CI UL | 0,78 | 29 | 6,4 | 10 | 48 | 48 | 0,82 | 48 | 0,78 | 18 | 13 | 48 | 48 | 1,1 | 48 | 10 | 2,4 |
| MST-18 | NPP/100mL | 0,34 | 0,81 | <0,096 | 1,3 | 9,2 | <0,096 | 0,13 | <0,096 | [a] | 0,13 | 0,8 | 0,72 | <0,096 | <0,096 | 3,5 | 16 | <0,096 |
| | 95% CI LL | 0,09 | 0,28 | 0,012 | 0,48 | 2,9 | 0,012 | 0,02 | 0,012 | | 0,02 | 0,28 | 0,24 | 0,012 | 0,012 | 1,2 | 5,4 | 0,012 |
| | 95% CI UL | 1,3 | 2,4 | 0,78 | 3,5 | 29 | 0,78 | 0,82 | 0,78 | | 0,82 | 2,4 | 2,2 | 0,78 | 0,78 | 10 | 48 | 0,78 |
| MST-20 | NPP/100mL | 1,3 | <0,096 | <0,096 | 0,81 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | [a] | [a] | <0,096 | 0,65 | 0,29 | 9,2 | 1,7 | 0,81 | <0,096 |
| | 95% CI LL | 0,48 | 0,012 | 0,012 | 0,28 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | | | 0,012 | 0,21 | 0,074 | 2,9 | 0,65 | 0,28 | 0,012 |
| | 95% CI UL | 3,5 | 0,78 | 0,78 | 2,4 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | | | 0,78 | 2 | 1,1 | 29 | 4,6 | 2,4 | 0,78 |
| MST-22 | NPP/100mL | 0,95 | 0,13 | <0,096 | <0,096 | 0,1 | <0,096 | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | <0,096 | 0,13 | <0,096 | 5,4 | <0,096 | <0,096 |
| | 95% CI LL | 0,33 | 0,02 | 0,012 | 0,012 | 0,013 | 0,012 | | | | | | 0,012 | 0,02 | 0,012 | 1,6 | 0,012 | 0,012 |
| | 95% CI UL | 2,7 | 0,82 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | | | | | | 0,78 | 0,82 | 0,78 | 18 | 0,78 | 0,78 |
| MST-24 | NPP/100mL | <0,096 | <0,096 | 0,13 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | 0,13 | <0,096 | <0,096 | 0,1 | 0,5 | <0,096 | 0.1 | 3,5 | >16 |
| | 95% CI LL | 0,012 | 0,012 | 0,02 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,02 | 0,012 | 0,012 | 0,013 | 0,15 | 0,012 | 0,013 | 1,2 | 5,4 |
| | 95% CI UL | 0,78 | 0,78 | 0,82 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,82 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 1,6 | 0,78 | 0,78 | 10 | 48 |

[a]Il arrive parfois que les sites soient secs, surtout lors de période estivale, dons les analyses sont impossibles. NPP : nombre le plus probable; CI LL : intervalle de confiance de la limite inférieure; CI UL : intervalle de confiance de la limite supérieure.

**Tableau 4.7 : Concentration en NPP/100 mL selon les dates et les sites d'échantillonnages de 2012.**

| Site | | Date jj-mm-aaaa | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 07-05-2012 | 22-05-2012 | 04-06-2012 | 18-06-20121 | 03-07-20121 | 16-07-2012 | 30-07-2012 | 13-08-2012 | 27-08-2012 | 10-09-2012 | 24-09-2012 | 09-10-2012 | 22-10-2012 | 05-11-2012 |
| MST-1 | NPP/100mL | 0,27 | 0,1 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | 0,72 | 0,13 |
| | 95% CI LL | 0,066 | 0,013 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,24 | 0,02 |
| | 95% CI UL | 1,1 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 2,2 | 0,82 |
| MST-5 | NPP/100mL | 0,79 | 0,096 | 1,1 | 0,45 | 0,5 | 3,5 | 3,5 | >16 | 0,5 | 0,1 | <0,096 | <0,096 | 0,5 | <0,096 |
| | 95% CI LL | 0,27 | 0,012 | 0,38 | 0,13 | 0,15 | 1,2 | 1,2 | 5,4 | 0,15 | 0,013 | 0,012 | 0,012 | 0,15 | 0,012 |
| | 95% CI UL | 2,3 | 0,78 | 3 | 1,5 | 1,6 | 10 | 10 | 48 | 1,6 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 1,6 | 0,78 |
| MST-6 | NPP/100mL | 0,34 | <0,096 | 2,8 | 0,27 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | 2,4 | 0,21 | <0,096 | 0,21 | 1,4 | 2,8 |
| | 95% CI LL | 0,09 | 0,012 | 1 | 0,066 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,89 | 0,046 | 0,012 | 0,046 | 0,52 | 1 |
| | 95% CI UL | 1,3 | 0,78 | 7,6 | 1,1 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 6,4 | 0,97 | 0,78 | 0,97 | 3,8 | 7,6 |
| MST-8 | NPP/100mL | 0,13 | <0,096 | 0,13 | 0,13 | <0,096 | <0,096 | <0,096 | 0,1 | 0,1 | 0,13 | <0,096 | [a] | [a] | [a] |
| | 95% CI LL | 0,02 | 0,012 | 0,02 | 0,02 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,013 | 0,013 | 0,02 | 0,012 | | | |
| | 95% CI UL | 0,80 | 0,78 | 0,82 | 0,82 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,82 | 0,78 | | | |
| MST-9 | NPP/100mL | 0,096 | 0,59 | 3,5 | 0,21 | 0,2 | <0,096 | <0,096 | 2,4 | 0,13 | >16 | >16 | 16 | 1,7 | 2,8 |
| | 95% CI LL | 0,012 | 0,19 | 1,2 | 0,046 | 0,043 | 0,012 | 0,012 | 0,89 | 0,02 | 5,4 | 5,4 | 5,4 | 0,65 | 1 |
| | 95% CI UL | 0,78 | 1,9 | 10 | 0,97 | 0,95 | 0,78 | 0,78 | 6,4 | 0,82 | 48 | 48 | 48 | 4,6 | 7,6 |
| MST-18 | NPP/100mL | <0,096 | 0,45 | 0,87 | 0,096 | <0,096 | [a] | [a] | [a] | [a] | 3,5 | <0,096 | 1,1 | 0,5 | 0,57 |
| | 95% CI LL | 0,012 | 0,13 | 0,3 | 0,012 | 0,012 | | | | | 1,0 | 0,012 | 0,39 | 0,15 | 0,18 |
| | 95% CI UL | 0,78 | 1,5 | 2,5 | 0,78 | 0,78 | | | | | 10 | 0,78 | 3 | 1,6 | 1,8 |
| MST-20 | NPP/100mL | 0,34 | 3,5 | 9,2 | 1,1 | <0,096 | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | 0,29 |
| | 95% CI LL | 0,09 | 1,2 | 2,9 | 0,38 | 0,012 | | | | | | | | | 0,074 |
| | 95% CI UL | 1,3 | 10 | 29 | 3 | 0,78 | | | | | | | | | 1,1 |
| MST-22 | NPP/100mL | <0,096 | 0,096 | 9,2 | <0,096 | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] | [a] |
| | 95% CI LL | 0,012 | 0,012 | 2,9 | 0,012 | | | | | | | | | | |
| | 95% CI UL | 0,78 | 0,78 | 29 | 0,78 | | | | | | | | | | |
| MST-24 | NPP/100mL | <0,096 | 0,34 | 0,1 | <0,096 | 0,13 | 0,48 | 0,096 | 0,13 | 0,1 | 0,29 | <0,096 | 0,29 | 0,13 | 1,4 |
| | 95% CI LL | 0,012 | 0,09 | 0,012 | 0,012 | 0,02 | 0,14 | 0,012 | 0,02 | 0,013 | 0,074 | 0,012 | 0,074 | 0,02 | 0,52 |
| | 95% CI UL | 0,78 | 1,3 | 0,78 | 0,78 | 0,82 | 1,6 | 0,78 | 0,82 | 0,78 | 1,1 | 0,78 | 1,1 | 0,82 | 3,8 |

[a]Il arrive parfois que les sites soient secs, surtout lors de période estivale, dons les analyses sont impossibles. NPP : nombre le plus probable; CI LL : intervalle de confiance de la limite inférieure; CI UL : intervalle de confiance de la limite supérieure.

## 4.5 Optimisation de mPCR pour la détection simultanée de plusieurs gènes de virulence, gènes de production de cytotoxines et gène de résistance à la tétracycline

Il a été primordial de réduire le temps de détection des gènes de virulence, de gènes de production de cytotoxines et du gène de résistance à la tétracycline vu le grand nombre d'isolats à analyser, la quantité de gènes à détecter et le temps restreint pour compléter les analyses. L'optimisation de protocoles mPCR s'est fait en jumelant les amorces avec des températures d'hybridation semblables et des longueurs de fragment différentes, en plus d'utiliser le logiciel OligoAnalyzer 3.1 de IDT technology afin d'éviter les dimères d'amorces. Si les résultats obtenus avec les souches de référence n'étaient pas satisfaisants, il était possible d'ajouter du DMSO, du BSA ou même d'augmenter le nombre de cycles afin d'obtenir des amplicons observables par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 4.4). Une mPCR n'a pas nécessité d'ajout de DMSO et de BSA (figure 4.5).

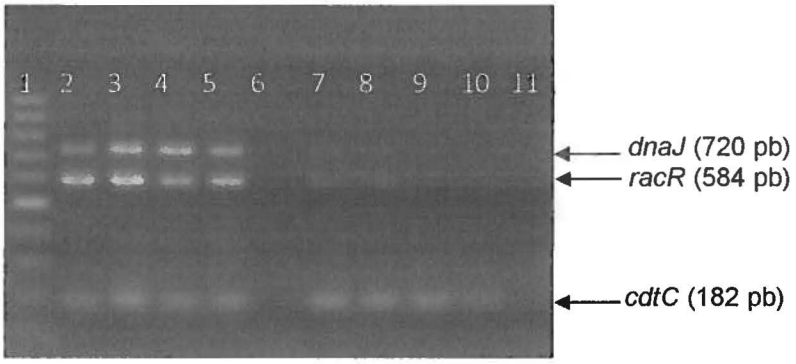


**Figure 4.4 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose obtenu après l'amplification des gènes en mPCR avec BSA et sans BSA.**

Amplification des gènes *racR*, *dnaJ* et *cdtC* en mPCR avec l'ajout de BSA (puits 2-6) et sans l'ajout de BSA (puits 7-11). Puits 1 : 100 pb échelle ADN marqueur de taille, puits 2-5 et 7-10 : isolats aquatiques *C. jejuni* et puits 6-11 : eau nano-pure. L'ajout de BSA était nécessaire pour bien observer les résultats.

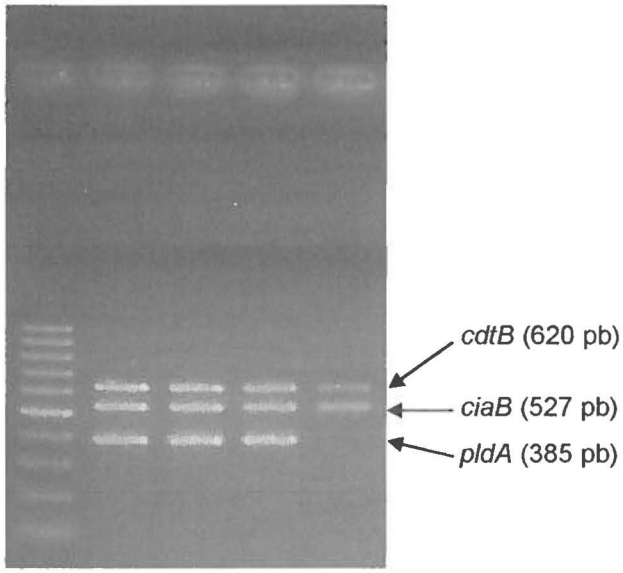


**Figure 4.5 : Résultat de l'électrophorèse sur gel d'agarose d'une mPCR ne nécessitant pas de DMSO ou de BSA.**

Gel d'agarose obtenu après l'amplification des gènes *ciaB*, *pldA* et *cdtB* en mPCR. Puits 1 : 100 pb échelle ADN marqueur de taille, puits 2 : *C. jejuni* ATCC 29428 positif pour les trois gènes amplifiés et puits 3-5 : isolats aquatiques *C. jejuni* positifs pour deux ou trois gènes de virulence. PCR multiplex ne nécessitant pas l'ajout de DMSO ou de BSA.

## 4.6 Détection des gènes de virulence, gènes de production de cytotoxines et du gène de résistance à la tétracycline

Lorsque l'optimisation des mPCR a été complétée, il a fallu tester ce protocole sur des échantillons aquatiques *Campylobacter*. Les premiers essais étant concluants, la détection des gènes s'est effectuée sur tous les isolats 2010 (tableau 4.8). Selon l'analyse, plusieurs gènes semblaient absents chez *C. coli* et *C. lari* (*cdtABC*, *cdtA*, *cdtB*, *pldA*, *ciaB*, *cj0588*). De plus, tous les gènes étaient présents dans un plus grand pourcentage de *C. jejuni* sauf les gènes *racR* et *flaA* qui se retrouvaient plus souvent chez *C. coli* et/ou *C. lari*. Le gène *cdtC* se retrouvait le plus souvent (86,0 %) parmi les isolats obtenus lors de cette étude. Le gène *tet(O)* et le gène *cdtACB* étaient plutôt rares chez les *Campylobacter* récupérés (9,8 % et 12,8 % respectivement).

**Tableau 4.8 : Nombre (pourcentage) de gènes de virulence, de gènes de production de cytotoxines et du gène de résistance à la tétracycline détecté chez les isolats caractérisés comme étant *C. jejuni*, *C. coli* et *C. lari* en 2010**

| | No. Isolats | Production de cytotoxines | | | | Invasion | | Résistance à la tetracycline |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *cdtABC* | *cdtA* | *cdtB* | *cdtC* | *pldA* | *ciaB* | *tet(O)* |
| | n | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| *C. jejuni* | 430 | 60 (14,0) | 311 (72,3) | 326 (75,8) | 398 (92,6) | 309 (71,9) | 347 (80,7) | 45 (10,5) |
| *C. coli* | 26 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 4 (15,4) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 1 (3,8) |
| *C. lari* | 14 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 2 (14,3) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| Isolats totaux | 470 | 60 (12,8) | 311 (66,2) | 326 (69,4) | 404 (86,0) | 309 (65,7) | 347 (73,8) | 46 (9,8) |

| | No. Isolats | Adhérence et colonisation | | | | | Adhérence aux cellules Caco-2 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | *flaA* | *flaB* | *cadF* | *dnaJ* | *racR* | *cj0588* |
| | n | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| *C. jejuni* | 430 | 179 (41,6) | 373 (86,7) | 350 (81,4) | 87 (20,2) | 88 (20,5) | 275 (64,0) |
| *C. coli* | 26 | 12 (46,2) | 17 (65,4) | 17 (65,4) | 1 (3,8) | 7 (26,9) | 0 (0,0) |
| *C. lari* | 14 | 4 (28,6) | 7 (50,0) | 4 (28,6) | 0 (0,0) | 3 (21,4) | 0 (0,0) |
| Isolats totaux | 470 | 195 (41,5) | 397 (84,5) | 371 (78,9) | 88 (18,7) | 98 (20,9) | 275 (58,5) |

Afin de déterminer si les amplicons dérivés des isolats aquatiques correspondaient bien aux gènes ciblés, du séquençage a été effectué (Tableau 4.9). Certains gènes ont été découvert récemment et d'autres sont étudiés plus rarement, il était donc primordial d'assurer le séquençage des amplicons. Les séquences obtenues ont fait l'objet d'une analyse comparative « blast » dans les banques de données au niveau des séquences en nucléotides, mais aussi en acides aminés afin d'obtenir des résultats plus complets. Les séquences attendues ont été obtenues pour tous les amplicons.

**Tableau 4.9 : Résultats de séquençage de différent gène avec des souches références et quelques isolats obtenus de l'eau du bassin versant de la rivière South Nation**

| Isolat ou souche référence | Fragment séquencé | Résultat au séquençage (blast) | Résultat au blast de protéine |
|---|---|---|---|
| *Campylobacter jejuni* CW0022 | *cdtA* | Toxine de distension cytoléthale (génome complet de *C. jejuni*) | Cytochrome C de *C. jejuni* |
| *Campylobacter jejuni* CW0009 | *cdtA* | Toxine de distension cytoléthale (génome complet de *C. jejuni*) | Cytochrome C de *C. jejuni* ou toxine de distension léthale |
| *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 | *cdtA* | Toxine de distension cytoléthale (génome complet de *C. jejuni*) | Cytochrome C de *C. jejuni* ou toxine de distension léthale |
| *Campylobacter jejuni* CW0282 | *cdtB* | Toxine de distension cytoléthale (génome complet de *C. jejuni*) | Toxine de distension léthale B de *C. jejuni* |
| *Campylobacter jejuni* CW0283 | *cdtB* | Toxine de distension cytoléthale de *C. jejuni* | Aucune similarité |
| *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 | *cdtB* | Toxine de distension cytoléthale (génome complet de *C. jejuni*) | Aucune similarité |
| *Campylobacter jejuni* CW0009 | *cdtC* | *cdtC* de *C. jejuni* | Toxine de distension léthale C de *C. jejuni* |
| *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 | *cdtC* | *cdtC* de *C. jejuni* | Protéine hypothétique de *Capselle rubella* |
| *Campylobacter jejuni* CW0282 | *ciaB* | *ciaB* (génome complet de *C. jejuni*) | Aucune similarité |
| *Campylobacter jejuni* CW0283 | *ciaB* | *ciaB* (génome complet de *C. jejuni*) | Aucune similarité |
| *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 | *ciaB* | *ciaB* (génome complet de *C. jejuni*) | Aucune similarité |
| *Campylobacter jejuni* ssp. *doylei* ATCC 49349 | *ciaB* | Génome complet de *C. jejuni* spp. *doylei* | Protéine hypothétique de *Paramecium tetraurelia* |
| *Campylobacter jejuni* CW0292 | *cj0588* | Génome complet de *C. jejuni* | Protéine de *Pseudanabaena biceps* |
| *Campylobacter jejuni* CW0286 | *cj0588* | Génome complet de *C. jejuni* | Protéine hypothétique de *Desulfobacter* |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | *curvatus* |
| *Campylobacter jejuni ATCC 29428* | *cj0588* | Génome complet de *C. jejuni* | Aucune similarité |
| *Campylobacter jejuni* CW0009 | *dnaJ* | *dnaJ* de *C. jejuni* | Protéine de la membrane de *Sterptococcus sanguinis* |
| *Campylobacter jejuni* CW0281 | *dnaJ* | *dnaJ* de *C. jejuni* | DnaJ de *C. jejuni* |
| *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 | *dnaJ* | *dnaJ* (protéine de choc thermique de *C. jejuni*) | DnaJ de *C. jejuni* |
| *Campylobacter jejuni* CW0293 | *flaA* | *flaA* de *C. jejuni* | Glyrophosphodiester |
| *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 | *flaA* | *flaA* de *C. jejuni* | CreC de *Klebsiella pneumoniae* |
| *Campylobacter jejuni* ssp. *doylei* ATCC 49349 | *flaA* | *flaA* de *C. jejuni* | Flagelle partiel de *C. coli* |
| *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 | *flaB* | *accB* et *accC* ou *flaA* et *flaB* de *C. jejuni* | Aucune similarité |
| *Campylobacter jejuni* CW0281 | *pldA* | *pldA* de *C. jejuni* | Phospholipase A de *C. jejuni* |
| *Campylobacter jejuni* CW0282 | *pldA* | *pldA* de *C. jejuni* | Phospholipase A de *C. jejuni* |
| *Campylobacter jejuni* ATCC 29428 | *pldA* | *pldA* de *C. jejuni* | Phospholipase A de *C. jejuni* |
| *Campylobacter jejuni* CW0009 | *racR* | *racR* (génome complet de *C. jejuni*) | Régulateur à deux composantes de *C. coli* |
| *Campylobacter jejuni* CW0281 | *racR* | *racR* (génome complet de *C. jejuni*) | Aucune similarité |
| *Campylobacter fetus* ssp. *fetus* ATCC 27374 | *tet(O)* | *C. jejuni* ssp. *jejuni* ou *C. coli* | Protéine partielle de résistance à la tétracycline (*Campylobacter*) |
| *Campylobacter jejuni* CW0022 | *tet(O)* | Plasmide de *C. coli* | Protéine ribosomal 50S de L13 *Prevotella* |
| *Campylobacter jejuni* CW0009 | *tet(O)* | Génome complet de *C. jejuni* ou plasmide de *C. coli* pour la résistance à la tétracycline | Protéine de résistance à la tétracycline de *C. coli* |

# 5 DISCUSSION

Cette étude diffère des autres déjà publiées, car elle comprenait l'isolement, la caractérisation au niveau du genre, de l'espèce des isolats issus d'environnement aquatiques et pour lequel la sélection pour les *Campylobacter* a été effectuée. De plus, notre étude a également visé la détection des gènes de virulence, de production de cytotoxine et de la résistance à la tétracycline de plusieurs milliers d'isolats. La plupart des articles retrouvés faisaient mention d'un maximum de plusieurs centaines d'isolats (Cloak *et al.*, 2002; Datta *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2006; Krutkiewicz *et al.*, 2010). Le nombre restreint d'isolats dans la plupart des cas était sûrement dû à la difficulté d'isolement des souches de *Campylobacter*. Celles-ci sont fastidieuses et elles sont souvent endommagées, ou dans un état viable mais non cultivable, lorsqu'elles se retrouvent dans l'eau ou d'autres environnements hostiles. De plus, les études effectuées sur une période de temps sur le même territoire sont plutôt rares. Ce genre d'expérience sur une période de trois ans pourrait permettre de déterminer si la concentration de *Campylobacter* est en hausse à travers les années. Plusieurs études se sont intéressées à la présence de *Campylobacter* dans des échantillons alimentaires ou cliniques tandis que les études sur les eaux de surface sont limitées. Lors de recherches préliminaires, seulement un article faisait mention de l'utilisation de mPCR (Kabir *et al.*, 2011) pour la détection de gène de production de cytotoxines chez *Campylobacter*. Dans notre étude, l'utilisation de mPCR pour la détection d'un grand nombre de gènes de virulence, de gènes de production de cytotoxines et du gène de résistance à la tétracycline a été une première dans ce domaine. Enfin, notre étude comprenait plusieurs nouveaux aspects dont la quantification et la caractérisation de plusieurs milliers de souches aquatiques sur une période de trois ans dans les eaux de surface ainsi que l'utilisation de mPCR pour la détection de gènes permettant d'obtenir un indice sur la virulence et le danger des souches aquatiques *Campylobacter*.

## 5.1 La sélection des sites selon les résultats de présence/absence de *Campylobacter*

Les analyses de présence/absence ont été effectuées en 2009 avant le début du projet. La première sélection s'est effectuée en se basant sur la forte présence de *Campylobacter* aux sites d'échantillonnage. La présence relativement élevée de *Campylobacter* spp. à certains sites pourrait être dûe à la proximité d'une ferme laitière, à l'épandage de fumier, à la présence

de bernaches et/ou aux activités agricoles. De plus, plusieurs autres paramètres physico-chimiques ont pu être responsables d'une concentration plus ou moins élevée de *Campylobacter* spp. par exemple : le débit de la rivière South Nation ou du cours d'eau, la turbidité de l'eau, la pente de la berge, le pH de l'eau, la température de l'eau, etc.

En 2010, les sites choisis étaient similaires en plus d'être en majorité très près les uns des autres (voir encadrés rouges sur la figure 5.1). Quatre sites sur cinq se trouvaient à proximité de terres servant à la production de maïs et de soya et dans une étendue de 2 $km^2$ (MST-18, MST-19, MST-20 et MST-21). Le site MST-5, qui a aussi été analysé en 2010, se trouvait à proximité de fermes laitières et de marécages ou forêt, ce qui apportait une nouvelle dimension aux analyses de quantification. Cependant, en 2010, les sites qui avaient été ciblés comme témoin en 2011 et 2012 n'ont pas été inclus dans les expériences. Le site MST-1 aurait pu permettre de comparer la qualité de l'eau à un site servant à l'alimentation d'une usine de traitement des eaux et avec une profondeur différente (6 m plutôt qu'à la surface). Le site MST-24 aurait pu permettre de comparer entre les sites affectés ou à proximité des terres agricoles ou des milieux urbains et un site qui se trouve entouré de forêt et d'animaux sauvages.

En 2011 et 2012, une nouvelle sélection de sites s'est effectuée afin d'inclure les sites contrôles et d'avoir une plus grande diversité entre les sites analysés. La nouvelle sélection des sites à l'étude pourrait permettre l'intégration de nouveaux paramètres pour des analyses statistiques, car ils sont plus éloignés et plus diversifiés. De plus, pour pouvoir observer les différences possibles, s'il y a lieu, entre les deux années, la sélection des sites a été conservée entre 2011 et 2012 (MST-1, MST-5, MST-6, MST-8, MST-9, MST-18, MST-20, MST-22 et MST-24) (voir les encadrés jaunes sur la figure 5.1).

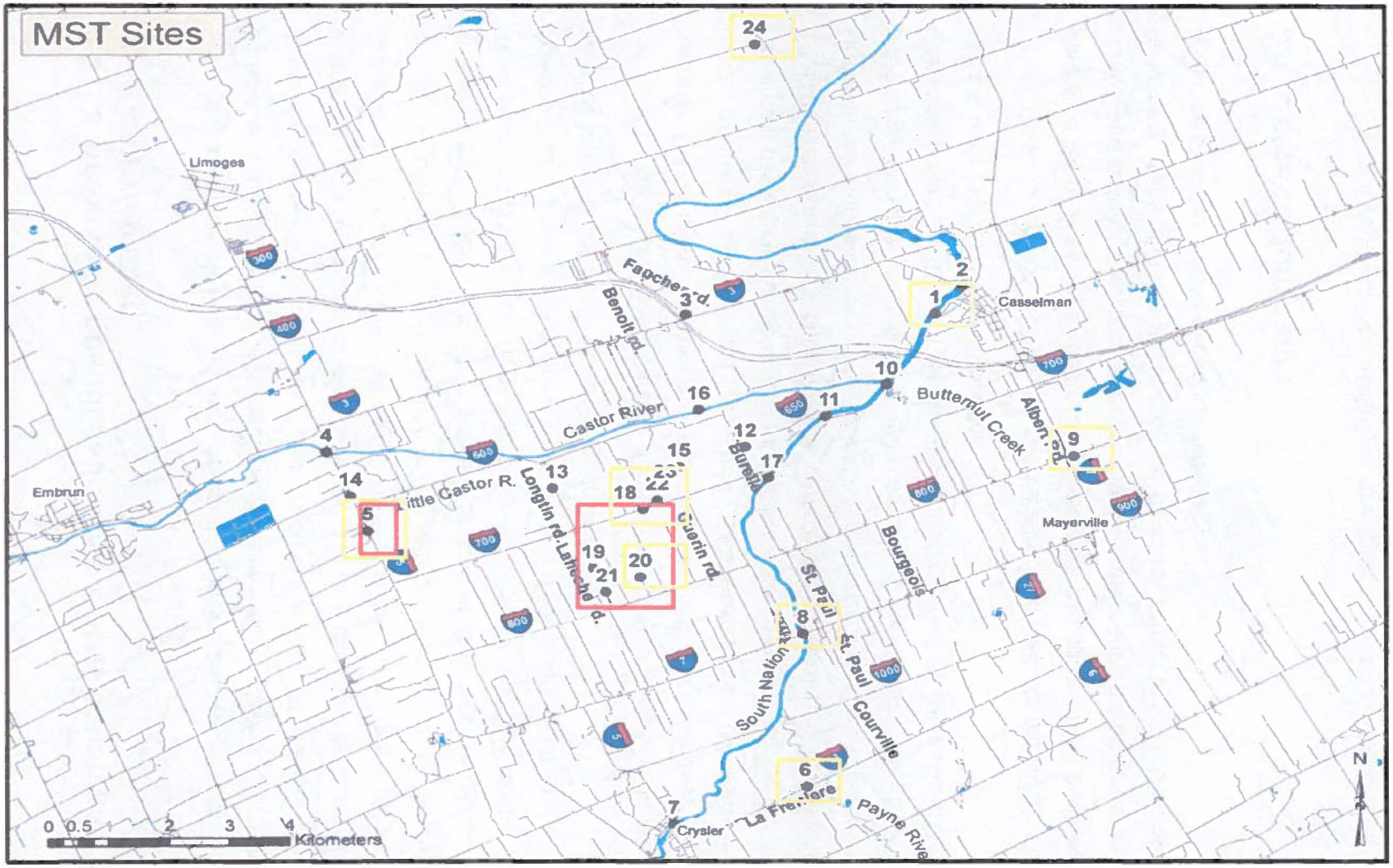


**Figure 5.1 : Localisation des sites**

Sites sélectionnés pour les analyses en 2010 (encadrés rouges). Sites sélectionnés pour 2011-2012 (encadrés jaunes).

## 5.2 La méthode de quantification des isolats aquatiques de *Campylobacter*

La méthode NPP a été en général plus efficace pour la quantification des isolats aquatiques *Campylobacter* que la méthode d'ensemencement direct. Une réelle différence a été observée pour les échantillons de l'automne où la méthode DP n'a pas semblé efficace. Il se pourrait que la température de l'eau ait joué un rôle sur la quantification des isolats *Campylobacter*, surtout si la méthode DP a été utilisée. Dans notre étude, la méthode NPP utilisait un bouillon d'enrichissement (mPB) qui avait pour but de ressusciter les cellules endommagées. Cependant, cette étape d'enrichissement aurait pu aussi être responsable d'une surquantification, car elle permet aux cellules de se répliquer pendant 48 heures dans le bouillon et cela aurait pu fausser les résultats de quantification. C'est pour cela que la figure 4.1 est sous forme de site positif et non de quantification.

Pour ce qui est des différents milieux de culture utilisés pour la quantification avec la méthode DP, le milieu Karmali (Fig. 4.2) a été un des plus favorables. De plus, ce milieu a permis d'obtenir le plus d'isolats (Tableau 4.2). Cependant, il est un des moins spécifiques pour l'isolement d'isolats *Campylobacter* lorsqu'utilisé dans avec la méthode DP. Par contre, comme il fallait plusieurs isolats pour faire la caractérisation ainsi que la détection des gènes de virulence, de production de cytotoxines et de résistance à la tétracycline, le milieu Karmali a été préférable. Lorsque ce milieu a été combiné à la méthode de NPP avec le bouillon d'enrichissement (mPB), il a permis de recueillir plusieurs centaines d'isolats et d'être très sélectif, avec moins de 2,0 % d'inconnu.

Donc, la méthode NPP a été choisie afin de recueillir le maximum d'isolat et de ne pas perdre de temps à isoler des bactéries qui n'étaient pas apparentées aux *Campylobacter* par la suite. Cette technique est plus sélective et relativement simple à effectuer en plus de permettre l'isolement d'une quantité importante de souches aquatiques de *Campylobacter*, mais elle demande plusieurs étapes et beaucoup de temps.

## 5.3 L'espèce dominante

Grâce à l'analyse des affiliations des isolats aux *Campylobacter*, il a été possible de déterminer que l'espèce dominante était *C. jejuni* (tableau 4.3; 4.4 et 4.5). Cependant, cette

conclusion est relative, car la méthode utilisée est peut-être plus sélective pour les *C. jejuni* que pour les autres espèces, par exemple certaines espèces de *Campylobacter* préfèrent une température de 37°C, l'absence de certains antibiotiques et une atmosphère enrichie de $H_2$ (Corry *et al.*, 1995; Jacob *et al.*, 2011; Jokinen *et al.*, 2012). La température d'incubation, les conditions microaérophiles, ainsi que les milieux de croissance et les antibiotiques ont probablement favorisé l'isolement de *C. jejuni*. Lorsque la technique DP a été utilisée, il a été possible d'observer une différence de l'espèce dominante selon le milieu d'isolement utilisé (Tableau 4.2). Avec les milieux *AHB* et *Karmali,* l'espèce prépondérante était *C. jejuni*, mais avec le mCCDA c'était plutôt *C. coli* tandis que le milieu LINE permettait d'obtenir pratiquement autant de *C. coli* que de *C. jejuni*.

Les résultats compilés pour l'année 2010 comprenaient les isolats obtenus grâce aux deux méthodes (DP et NPP). La méthode DP ainsi que la méthode NPP ont permis d'isoler plus de *C. coli* que de *C. lari,* ce qui en ferait la seconde espèce dominante (tableau 4.1). Cependant, plus du trois-quarts des isolats affiliés comme *C. coli* proviennent du site MST-19, ce site n'a pas été testé en 2011 et 2012 ce qui rend difficile la comparaison entre les trois années. Si on ne considère pas ce site pour l'analyse des espèces prédominantes, alors *C. lari* devient la deuxième espèce dominante en 2010, tout comme en 2011 et 2012. Les sites MST-5, MST-18 et MST-20 ont été conservés à travers les trois années de l'étude, bien que *C. jejuni* soit toujours l'espèce dominante pour ces sites, la seconde espèce diffère légèrement selon l'année et, en 2012 au site MST-20, aucun isolat n'a été identifié comme étant *C. coli* ou *C. lari*. Cela pourrait être dû au climat différent selon l'année ainsi que les périodes de prélèvements des échantillons différents, en 2010 il n'y a pas eu d'échantillonnage au printemps.

Il est impossible de déterminer avec certitude l'espèce *Campylobacter* dominante retrouvée dans le bassin versant de la rivière South Nation, car comme démontré par les résultats du tableau 4.2 les résultats dépendent du milieu de culture utilisé et des conditions de croissance, et plusieurs articles (Acke *et al.*, 2009; Lévesque *et al.*, 2011; Jokinen *et al.*, 2012; Ugarte-Ruiz *et al.*, 2012) ont démontré aussi que la méthode d'isolement peut faire varier les résultats. Les seuls moyens d'éviter cette confusion seraient de travailler avec plusieurs techniques simultanément ou d'extraire directement l'ADN des échantillons et de là, faire des PCR ou du séquençage. De plus, la deuxième espèce prépondérante n'est pas constante à travers les années malgré que la technique reste la même.

## 5.4 Quantification de *Campylobacter*

La méthode NPP a été utilisée afin de quantifier *Campylobacter* à toutes les deux semaines dans le réservoir de la rivière South Nation. Cette quantification s'est échelonnée sur trois ans pour différents sites d'échantillonnage. La quantification de *Campylobacter* a été soumise à certaines contraintes comme la limite de détection. Lors des trois années de cette quantification, il est arrivé à plusieurs reprises que les résultats dépassent la limite supérieure ou la limite inférieure de la quantification par la méthode de NPP. Lorsqu'un résultat dépasse la limite supérieure de quantification, il est impossible de compter le nombre de colonies qui ont poussé sur la gélose. Ainsi, la quantification exacte est impossible et tout ce qui peut être confirmé est que l'échantillon a plus de 16 NPP/100 mL. De plus, lorsque la limite de détection inférieure est atteinte cela veut dire qu'aucune colonie n'a poussé sur les géloses. Pour obtenir des résultats et pouvoir effectuer la quantification exacte, il faudrait envisager faire la filtration de plus petits volumes et de plus grands, par exemple : faire 5 dilutions (1 L, 500 mL, 100 mL, 10 mL et 2 mL). Enfin, le climat estival a parfois desséché les sites d'échantillonnage ce qui a empêché la prise d'un échantillon et du fait même la quantification de celui-ci. Plusieurs résultats étaient donc absents, et il peut être parfois difficile de faire des analyses statistiques ou même de simplement comparer les résultats lorsqu'une série est incomplète.

## 5.5 Détection de gènes par PCR multiplex

L'optimisation des mPCR a demandé beaucoup temps au niveau de l'analyse, mais aussi des essais avec les différents paramètres. Chaque amorce a dû être testée avec toutes les autres amorces pouvant être jumelées. Par la suite, les nouvelles mPCR ont été testées avec différentes souches de référence et certains paramètres ont dû être ajustés afin d'avoir le meilleur rendement possible. Au départ, l'étude contenait deux paires d'amorces ciblant le même gène (résultats non démontrés) pour quelques-uns des gènes. Cela permettait une plus grande flexibilité au niveau des jumelages. Les ajouts de BSA, de DMSO et de cycles supplémentaires ont joué un rôle quant aux résultats observés. Les nouvelles mPCR étaient très sensibles et requéraient des paramètres spécifiques selon les amorces utilisées.

Les mPCR ont permis de détecter rapidement 13 gènes chez 470 isolats de *Campylobacter*, ce qui représente un très grand nombre d'isolats comparé aux études retrouvées dans la littérature (Datta *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2006; Krutkiewicz *et al.*, 2010).

Les gènes de production de cytotoxines (*cdtA*, *cdtB* et *cdtC*) étaient présents dans un grand nombre d'isolats *C. jejuni* (>72,3 %), mais pas chez les *C. coli* et *C. lari* (<15,4 %). Cela peut s'expliquer par la spécificité des amorces utilisées qui ciblait les gènes de *C. jejuni* plutôt que des autres espèces. Les amorces utilisées pour amplifier les trois gènes de production de cytotoxines simultanément (*cdtABC*) donnent des résultats plutôt faibles (<15 %). Il pourrait s'agir d'un problème au niveau de la séquence des amorces qui ne concorde pas avec les séquences en acides nucléiques des isolats *Campylobacter* aquatiques. Il serait très intéressant de vérifier la production de cytotoxines ou l'expression de ces gènes chez certains échantillons aquatiques afin de valider les résultats obtenus par l'amplification PCR.

Les gènes d'invasion (*pldA* et *ciaB*) ont été retrouvés chez les *C. jejuni* seulement. Encore une fois, il est possible que les amorces soient spécifiques à *C. jejuni*. Les résultats suggèrent que *C. jejuni* a la capacité d'envahir des cellules, car il possède en général (>71,9 %) deux gènes putatifs qui facilitent l'invasion. Il serait primordial de tenter une délétion de ces gènes pour voir l'impact que ça aurait sur la capacité de *C. jejuni* à envahir des cellules. Pour ce qui est de la présence des gènes d'adhérence et de colonisation (*flaA*, *flaB*, *cadF*, *dnaJ* et *racR*), les résultats sont assez variables. Les amorces ont pu amplifier les séquences chez *C. coli*, *C. jejuni* et *C. lari*, sauf pour le gène *dnaJ* chez *C. lari*. Cette non-amplification peut être due à la spécificité des amorces ou de l'absence du gène chez les isolats *C. lari* testés. De plus, il est possible que la détection des gènes d'adhérence et de colonisation ne soit pas aussi efficace chez *C. coli* et *C. lari*, car les amorces ont été conçues pour *C. jejuni*. Pour les gènes *flaA* (46,2 et 41,6 %) et *racR* (26,9 et 20,5 %) la fréquence de détection est plus grande chez *C. coli* que *C. jejuni* et *racR* est plus souvent retrouvé chez *C. lari* que *C. jejuni* (21,4 et 20,5 % respectivement). L'adhérence aux cellules ainsi que leur colonisation pourraient donc être facilitées par la présence de ces cinq gènes chez les trois espèces étudiées.

La présence du gène *cj0588* chez un isolat lui permettrait d'adhérer plus facilement aux cellules Caco-2 ce qui suggère une meilleure adhérence aux cellules épithéliales du système gastro-intestinal. Ce gène a seulement été détecté chez *C. jejuni*, peut-être parce que (encore une fois) les amorces sont seulement spécifiques à cette espèce ou que *C. coli* et *C. lari* n'ont pas ce gène.

La résistance à la tétracycline peut être conférée par le gène *tet(O)* qu'on retrouve habituellement sur un plasmide; ce plasmide peut se transférer entre les différentes espèces de *Campylobacter*. Il est donc possible de penser que les amorces utilisées ont la capacité de détecter ce gène dans toutes les espèces étudiées. Ce gène a été détecté chez 10,5 % des

isolats *C. jejuni* et 3,8 % des isolats *C. coli*. Ces résultats indiqueraient que peu des isolats aquatiques détiennent le plasmide conférant la résistance à la tétracycline. Le milieu aquatique n'est pas favorable à la croissance ou la survie des *Campylobacter*. La résistance aux antibiotiques peut s'observer à l'aide d'une expérience très rapide d'antibiogramme et cela permettrait de déterminer s'il y a une corrélation entre la résistance à la tétracycline et la présence du gène *tet(O)*.

Bien que les gènes ciblés dans cette étude soient présents, cela ne veut pas dire que les isolats soient capables de les exprimer. Des expériences futures devraient analyser l'expression de ces gènes et aussi tenter de confirmer si ces gènes sont vraiment impliqués dans les processus de production de cytotoxines et de virulence, car pour l'instant ils sont seulement putatifs. De plus, il serait intéressant de développer des amorces qui puissent détecter ces gènes chez plusieurs espèces de *Campylobacter* simultanément, ainsi les études de détection seraient plus efficaces et rapides. Enfin, l'utilisation de mPCR a bien réussi et s'est avérée être un bon moyen de diminuer les coûts ainsi que le temps requis pour réaliser la détection chez 470 isolats aquatiques.

L'approche par mPCR a donc permis de faire la détection de plusieurs gènes de façon simultanée, rapide, économique et efficace dans la plupart des cas. De plus, les études qui appliquent les mPCR pour la détection des gènes de virulence, de production de cytotoxines ou de résistance aux antibiotiques chez *Campylobacter* spp. sont extrêmement rares, et les études qui le font sur des isolats aquatiques sont quasi-inexistantes. Cette étude est donc un premier pas dans l'optimisation et l'utilisation de mPCR à des fins de détection de plusieurs gènes pouvant donner une indication sur le danger des souches aquatiques.

# 6 CONCLUSION

L'épandage de fumier, l'activité agricole et les fosses septiques sont responsables d'une partie de la contamination fécale des sols et des eaux de surface. Par le biais du ruissellement, des pathogènes humains tels que *Escherichia coli*, *Arcobacter* et *Campylobacter* atteignent les rivières et les lacs où sont pratiqués des sports nautiques et où les municipalités s'alimentent en eau. Lors de sports nautiques, il est impossible de ne pas ingérer une certaine quantité ce qui peut conduire à une infection par *Campylobacter* qui peut être mortelle ou peut causer des problèmes à long terme comme le côlon irritable et de l'arthrite (Ajene *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2014). De plus, l'eau de surface est soumise à divers traitements avant d'être considérée potable et distribuée, mais il arrive parfois que quelques microorganismes survivent à ces traitements ou qu'une contamination comme à Walkerton survienne. La présence de pathogènes dans l'eau potable d'une municipalité occasionne de graves problèmes, car toute la population est alors à risque.

Les sources de contamination en *Campylobacter* des eaux de surface sont très variées et les infections peuvent parfois être très dangereuses. C'est pourquoi les études sur la fréquence de *Campylobacter* ou d'autres pathogènes dans l'environnement sont maintenant plus populaires. Cependant, peu d'entre elles se font sur plusieurs années, avec autant d'isolats obtenus pour des études futures et très peu détectent les gènes de virulence, de production de cytotoxines ou de résistance aux antibiotiques chez les isolats aquatiques. Cette étude se veut une entrée en matière et nécessite d'autres composantes afin d'en tirer plus de conclusion. La quantification par des méthodes de culture est très difficile et avantagerait la croissance de certaines espèces selon la température, la présence d'oxygène et le milieu de culture utilisé. Cependant, la quantification par des méthodes de biologie moléculaire ne permet pas d'obtenir des isolats en culture pure pour des expériences futures. Il serait important de pratiquer la méthode de qPCR pour la quantification des *Campylobacter* dans les eaux de surface afin d'obtenir des résultats plus précis et détecter plusieurs espèces. Les méthodes de culture devraient être conservées pour isoler certaines souches qui seront nécessaires pour des études futures. La méthode de culture a permis d'établir que dans la plupart des cas les sites plus près des zones agricoles avaient une concentration plus importante de *Campylobacter*. De plus, il était possible de voir des augmentations au début de l'été et à la fin, ce qui correspondait avec l'épandage de fumier. Plusieurs facteurs pourraient aussi avoir un impact sur cette concentration (pH, température, turbidité, débit, précipitations, etc.) et il semblerait que les plus

fortes concentrations en 2010 et 2011 auraient contribué à une plus importante concentration de *Campylobacter* dans les eaux de surface. Des études statistiques et des recherches plus approfondies pourraient déterminer quels facteurs ont plus d'impacts sur la concentration et ainsi il serait possible de prédire les périodes où la pratique des sports nautiques serait plus risquée.

La caractérisation des isolats au niveau du genre et de l'espèce a plutôt bien fonctionné, mais à long terme il serait nécessaire de concevoir une mPCR qui pourrait amplifier plusieurs espèces pathogènes simultanément qui sont susceptibles de se retrouvés dans les eaux de surface (*C. coli*, *C.fetus*, *C. jejuni*, *C. lari* et *C. upsaliensis*). Selon l'étude et la méthode d'isolement utilisée, *C. jejuni* serait l'espèce prédominante dans le bassin versant de la rivière South Nation.

La détection des gènes de virulence, de production de cytotoxines et de résistance à la tétracycline a été grandement simplifiée par la mise au point de PCR multiplex. Malheureusement, la plupart des paires d'amorces sélectionnées étaient spécifiques à *C. jejuni*. Il serait intéressant de développer des amorces ciblant les gènes de virulence présents chez *C. coli*, *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. lari* et *C. upsaliensis* et de faire des mPCR avec plusieurs paires d'amorces. De plus, le fait que les gènes soient présents ne stipule pas que les microorganismes soient capables de les exprimer; il serait important de vérifier au niveau de l'ARNm. Comme la présence du gène *tet(O)* est souvent reliée à la présence d'un plasmide, il faudrait vérifier si ce plasmide peut être échangé avec des pathogènes humains autres que *Campylobacter*.

Enfin, la forte concentration de *Campylobacter* dans les eaux de surface ainsi que la présence de plusieurs gènes de virulence, de production de cytotoxines et de la résistance à la tétracycline indiquent que les isolats aquatiques, surtout *C. jejuni*, ont le potentiel de causer des maladies chez l'humain. De plus, le nombre d'isolats résistant et multirésistant aux antibiotiques est en constante augmentation. Cette évolution est pour le moins inquiétante, car les infections par *Campylobacter* peuvent être responsables d'effets néfastes tels que l'arthrite réactive, le côlon irritable et le syndrome de Guillain-Barré (Ajene *et al.*, 2013; Nyati *et al.*, 2013; Nielsen *et al.*, 2014). Il est donc important de pouvoir traiter ces infections efficacement. Il est primordial d'instaurer une réglementation stricte quant à l'utilisation des antibiotiques dans l'agriculture afin d'arrêter la progression de cette tendance et traiter les personnes malades rapidement.

# LISTE DES RÉFÉRENCES


Acke E, McGill K, Golden O, Jones B, Fanning S & Whyte P (2009). "A comparison of different culture methods for the recovery of *Campylobacter* species from pets." Zoonoses and public health **56**(9□10): 490-495.

Adler-Mosca H, Lüthy-Hottenstein J, Lucchini GM, Burnens A & Altwegg M (1991). "Development of resistance to quinolones in five patients with campylobacteriosis treated with norfloxacin or ciprofloxacin." European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **10**(11): 953-957.

Agunos A, Léger D, Avery BP, Parmley EJ, Deckert A, Carson CA & Dutil L (2013). "Ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. in retail chicken, wertern Canada." Emerging Infectious Disease journal **19**(7):1121-4.

Ajene AN, Fischer Walker CL & Black RE (2013). "Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter, Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis." Journal of Health, Population and Nutrition **31**(3):299-307.

Allos B & Blaser MJ (2009). *Campylobacter jejuni* and related species. In Mandell, Douglas & Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease. Philadelphie, PA, Elsevier Publishing CO. Chapter 216: 2793-2802.

Altrock A, Louis A, Rösler U, Alter T, Beyerbach M, Kreienbrock L & Waldmann K (2006). "Untersuchungen zur bakteriologischen und serologischen Prävalenz von *Campylobacter* spp. und *Yersinia enteroco-litica* in niedersächsischen Schweinemastbeständen. Study on the bacteriological and serological prevalence of *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* in fattening pig herds in Lower Saxony." Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift **119**(9-10): 391-9.

Anonyme (2002). "Annual Report on Zoonoses in Denmark 2001." Ministry of Food, Agriculture and Fisheries.

Ashgar SS, Oldfield NJ, Wooldridge KG, Jones MA, Irving GJ, Turner DP & Ala'Aldeen DA (2007). "CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut." Journal of bacteriology **189**(5): 1856-1865.

Avrain L, Vernozy□Rozand C & Kempf I (2004). "Evidence for natural horizontal transfer of *tetO* gene between *Campylobacter jejuni* strains in chickens." Journal of applied microbiology **97**(1): 134-140.

Backert S, Boehm M, Wessler S & Tegtmeyer N (2013). "Transmigration route of *Campylobacter jejuni* across polarized intestinal epithelial cells: paracellular, transcellular or both?" Cell Communication and Signaling 11: 72.

Bang DD, Wedderkopp A, Pedersen K & Madsen M (2002). "Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (*hipO*) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples." Molecular and cellular probes **16**(5): 359-369.

Batchelor RA, Pearson BM, Friis LM, Guerry P & Wells JM (2004). "Nucleotide sequences and comparison of two large conjugative plasmids from different *Campylobacter* species." Microbiology **150**(10): 3507-3517.

Benjamin J, Leaper S, Owen R & Skirrow M (1983). "Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group." Current Microbiology **8**(4): 231-238.

Black RE, Levine MM, Clements ML, Hughes TP & Blaser MJ (1988). "Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans." Journal of Infectious Diseases **157**(3): 472-479.

Blaser MJ, Engberg J, Nachamkin I & Szymanski C (2008). Clinical aspects of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections, ASM Press.

Blaser MJ, Taylor DN & Feldman RA (1983). "Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections." Epidemiologic reviews **5**(1): 157-176.

Bolton F, Hutchinson D & Coates D (1984). "Blood-free selective medium for isolation of *Campylobacter jejuni* from feces." Journal of clinical microbiology **19**(2): 169-171.

Bolton F, Coates D, Hinchliffe P & Robertson L (1982a). "Most probable number method for estimating small numbers of campylobacters in water." Journal of Hygiene **89**: 185-190.

Bolton F & Robertson L (1982b). "A selective medium for isolating *Campylobacter jejuni/coli*." Journal of Clinical Pathology **35**(4): 462-467.

Botteldoorn N, Van Coillie E, Piessens V, Rasschaert G, Debruyne L, Heyndrickx M, Herman L & Messens W (2008). "Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real□ time PCR." Journal of applied microbiology **105**(6): 1909-1918.

Bras AM, Chatterjee S, Wren BW, Newell DG & Ketley JM (1999). "A novel *Campylobacter jejuni* two-component regulatory system important for temperature-dependent growth and colonization." Journal of Bacteriology **181**(10): 3298-3302.

Brennhovd O, Kapperud G & Langeland G (1992). "Survey of thermotolerant *Campylobacter* spp. and *Yersinia* spp. in three surface water sources in Norway." International journal of food microbiology **15**(3): 327-338.

Bridson E (1998). "The Oxoid Manual, Oxoid Ltd." Hampshire, United Kingdom.

Brown P, Christensen O, Clough H, Diggle P, Hart C, Hazel S, Kemp R, Leatherbarrow A, Moore A & Sutherst J (2004). "Frequency and spatial distribution of environmental *Campylobacter* spp." Applied and environmental microbiology **70**(11): 6501-6511.

Bruce K, Hiorns W, Hobman J, Osborn A, Strike P & Ritchie D (1992). "Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction." Applied and environmental microbiology **58**(10): 3413-3416.

Bryans JT, Smith AG & Baker AJ (1960). "Ovine vibrionic abortion caused by a new variety of *Vibrio*." Cornell Veterinarian **50**: 54-59.

Buck G & Kelly M (1981). "Effect of moisture content of the medium on colony morphology of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*." Journal of clinical microbiology **14**(5): 585-586.

Callicott K, Stern N & Hiett K (2005). "Isolation of DNA for PCR assays from noncultivable *Campylobacter jejuni* isolates." Poultry science **84**(10): 1530-1532.

Caner V, Cokal Y, Cetin C, Sen A & Karagenc N (2008). "The detection of *hipO* gene by real-time PCR in thermophilic *Campylobacter* spp. with very weak and negative reaction of hippurate hydrolysis." Antonie Van Leeuwenhoek **94**(4): 527-532.

Carrillo CD, Taboada E, Nash JH, Lanthier P, Kelly J, Lau PC, Verhulp R, Mykytczuk O, Sy J & Findlay WA (2004). "Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*." Journal of Biological Chemistry **279**(19): 20327-20338.

Carter JE & Cimolai N (1996). "Hemolytic-uremic syndrome associated with acute *Campylobacter upsaliensis* gastroenteritis." Nephron **74**(2): 489.

Chaban B, Musil KM, Himsworth CG & Hill JE (2009). "Development of *cpn60*-based real-time quantitative PCR assays for the detection of 14 *Campylobacter* species and application to screening of canine fecal samples." Applied and environmental microbiology **75**(10): 3055-3061.

Chatzipanagiotou S, Papavasiliou E & Malamou-Lada E (1993). "Isolation of *Campylobacter jejuni* strains resistant to nalidixic acid and fluoroquinolones from children with diarrhea in

Athens, Greece." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **12**(7): 566-568.

Chaveerach P, ter Huurne AA, Lipman LJ & van Knapen F (2003). "Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions." Applied and environmental microbiology **69**(1):711-4.

Clark CG, Price L, Ahmed R, Woodward DL, Melito PL, Rodgers FG, Jamieson F, Ciebin B, Li A & Ellis A (2003). "Characterization of waterborne outbreak–associated *Campylobacter jejuni*, Walkerton, Ontario." Emerging infectious diseases **9**(10): 1232.

Clark ST, Gilbride KA, Mehrvar M, Laursen AE, Bostan V, Pushchak R & McCarthy LH (2011). "Evaluation of low-copy genetic targets for waterborne bacterial pathogen detection via qPCR." Water Research **45**(11): 3378-3388.

Cloak OM & Fratamico PM (2002). "A multiplex polymerase chain reaction for the differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from a swine processing facility and characterization of isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic resistance profiles." Journal of Food Protection **65**(2): 266-273.

Corry JE, Post D, Colin P & Laisney M (1995). "Culture media for the isolation of campylobacters." International journal of food microbiology **26**(1): 43-76.

Coste J-F, Vuiblet V, Moustapha B, Bouin A, Lavaud S, Toupance O, de Rougemont A, Benejat L, Megraud F & Wolak-Thierry A (2013). "Microbiological diagnosis of severe diarrhea in kidney transplant recipients by use of multiplex PCR assays." Journal of clinical microbiology **51**(6): 1841-1849.

da Silva Quetz J, Lima IFN, Havt A, de Carvalho EB, Lima NL, Soares AM, Mota RMS, Guerrant RL & Lima AAM (2010). "*Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in children from communities in Northeastern Brazil: molecular detection and relation to nutritional status." Diagnostic microbiology and infectious disease **67**(3): 220-227.

Datta S, Niwa H & Itoh K (2003). "Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces." Journal of Medical Microbiology **52**(Pt 4): 345-348.

Debruyne L, On SL, De Brandt E & Vandamme P (2009). "Novel *Campylobacter lari*-like bacteria from humans and molluscs: description of *Campylobacter peloridis* sp. nov., *Campylobacter lari* subsp. *concheus* subsp. nov. and *Campylobacter lari* subsp. *lari* subsp. nov." International journal of systematic and evolutionary microbiology **59**(5): 1126-1132.

Debruyne L, Gevers D & Vandamme P (2008). "Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*." *Campylobacter*: 3-25.

Denis M, Henrique E, Chidaine B, Tircot A, Bougeard S & Fravalo P (2011). "*Campylobacter* from sows in farrow-to-finish pig farms: Risk indicators and genetic diversity." Veterinary microbiology **154**(1): 163-170.

Denis M, Soumet C, Rivoal K, Ermel G, Blivet D, Salvat G & Colin P (1999). "Development of am□PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*." Letters in applied microbiology **29**(6): 406-410.

Dingle K, Colles F, Wareing D, Ure R, Fox A, Bolton F, Bootsma H, Willems R, Urwin R & Maiden M (2001). "Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*." Journal of clinical microbiology **39**(1): 14-23.

Dingle KE, Colles FM, Falush D & Maiden MC (2005). "Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*." Journal of clinical microbiology **43**(1): 340-347.

Dorrell N, Martino MC, Stabler RA, Ward SJ, Zhang ZW, McColm AA, Farthing MJ & Wren BW (1999). "Characterization of *Helicobacter pylori* PldA, a phospholipase with a role in colonization of the gastric mucosa." Gastroenterology **117**(5): 1098-1104.

Doyle L (1948). "The etiology of swine dysentery." Am. J. Vet. Res **9**: 50-51.

Eaton AD & Franson M (2005). "Water Environment Federation." Standard methods for the examination of water & wastewater. Washington (DC): American Public Health Association.

European Food Safety Authority (2005). "Scientific Report of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to *Campylobacter* in animals and foodstuffs." EFSA J **173**: 1-105.

Ehlers J, Chapparo Serrano M, Richter R & Venderzant C (1982). "Survival of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in Cheddar and Cottage cheese." Journal of Food Protection **45**.

Florent A (1953). "Isolement d'un vibrion saprophyte du sperme du taureau et du vagin de la vache (*Vibrio bubulus*)." CR Soc. Biol **147**(2066): 575.

Friedman C (2000). "Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations." *Campylobacter*: 121-138.

Frisan T, Cortes-Bratti X & Thelestam M (2001). "Cytolethal distending toxins and activation of DNA damage-dependent checkpoint responses." International journal of medical microbiology **291**(6): 495-499.

Frost A (1991). "Antibiotics and animal production." World Animal Science.

Gao B, Lara-Tejero M, Lefebre M, Goodman AL & Galán JE (2014). "Novel components of the flagellar system in epsilonproteobacteria." MBio **5**(3):1349-14.

Gibreel A & Taylor DE (2006). "Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **58**(2): 243-255.

Gibreel A, Tracz DM, Nonaka L, Ngo TM, Connell SR & Taylor DE (2004). "Incidence of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with special reference to *tet(O)*-mediated tetracycline resistance." Antimicrobial agents and chemotherapy **48**(9): 3442-3450.

Gillespie IA, O'Brien SJ, Frost JA, Adak GK, Horby P, Swan AV, Painter MJ & Neal KR (2002). "A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses." Emerging infectious diseases **8**(9): 937-942.

Goon S, Kelly JF, Logan SM, Ewing CP & Guerry P (2003). "Pseudaminic acid, the major modification on *Campylobacter* flagellin, is synthesized via the Cj1293 gene." Molecular Microbiology **50**(2): 659-671.

Graham C, Whyte R, Gilpin B, Cornelius A, Hudson JA, Morrison D, Graham H & Nicol C (2005). "Outbreak of campylobacteriosis following pre-cooked sausage consumption." Australian and New Zealand journal of public health **29**(6): 507-510.

Grant KA, Belandia IU, Dekker N, Richardson PT & Park SF (1997). "Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis." Infection and immunity **65**(4): 1172-1180.

Gregory E, Barnhart H, Dreesen DW, Stern NJ & Corn JL (1997). "Epidemiological study of *Campylobacter* spp. in broilers: source, time of colonization, and prevalence." Avian diseases: 890-898.

Gupta A, Nelson JM, Barrett TJ, Tauxe RV, Rossiter SP, Friedman CR, Joyce KW, Smith KE, Jones TF & Hawkins MA (2004). "Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997–2001." Emerging infectious diseases **10**(6): 1102.

Gurgan T & Diker KS (1994). "Abortion associated with *Campylobacter upsaliensis*." Journal of clinical microbiology **32**(12): 3093-3094.

Habib I, Sampers I, Uyttendaele M, Berkvens D & De Zutter L (2008). "Baseline data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program." Applied and environmental microbiology **74**(17): 5483-5489.

Hald B, Wedderkopp A & Madsen M (2000). "Thermophilic *Campylobacter* spp. in Danish broiler production: a cross-sectional survey and a retrospective analysis of risk factors for occurrence in broiler flocks." Avian Pathology **29**(2): 123-131.

Han J, Sahin O, Barton Y-W & Zhang Q (2008). "Key role of Mfd in the development of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni*." PLoS pathogens **4**(6): e1000083.

Hani EK & Chan VL (1995). "Expression and characterization of *Campylobacter jejuni* benzoylglycine amidohydrolase (Hippuricase) gene in *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **177**(9): 2396-2402.

Hannon SJ, Taboada EN, Russell ML, Allan B, Waldner C, Wilson HL, Potter A, Babiuk L & Townsend HG (2009). "Genomics-based molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from feedlot cattle and from people in Alberta, Canada." Journal of clinical microbiology **47**(2): 410-420.

Health Canada (2000). "Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a contaminated municipal water supply, Walkerton, Ontario, May-June 2000." Canada Communicable Disease Report **26**(20): 170-173.

Hendrixson DR (2006). "A phase□variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism." Molecular microbiology **61**(6): 1646-1659.

Hickey TE, McVeigh AL, Scott DA, Michielutti RE, Bixby A, Carroll SA, Bourgeois AL & Guerry P (2000). "*Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells." Infection and immunity **68**(12): 6535-6541.

Hu L & Kopecko DJ (2008). "Cell biology of human host cell entry by *Campylobacter jejuni*." *Campylobacter*: 297-313.

Hu TL & Kuo PC (2011). "Isolation of *Campylobacter* sp in surface waters of Taiwan." Journal of Microbiology, Immunology and Infection **44**(1): 15-20.

Jacob P, Mdegela RH & Nonga HE (2011). "Comparison of Cape Town and Skirrow's *Campylobacter* isolation protocols in humans and broilers in Morogoro, Tanzania." Tropical Animal Health and Production **43**(5): 1007-1013.

Jacobs-Reitsma W, Lyhs U, Wagenaar J, Nachamkin I, Szymanski C & Blaser M (2008). "*Campylobacter* in the food supply." *Campylobacter*(Ed. 3): 627-644.

Jokinen C, Schreier H, Mauro W, Taboada E, Isaac-Renton J, Topp E, Edge T, Thomas J & Gannon V (2010). "The occurrence and sources of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157: H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada." Journal of water and health **8**(2): 374-386.

Jokinen CC, Koot JM, Carrillo CD, Gannon VP, Jardine CM, Mutschall SK, Topp E & Taboada EN (2012). "An enhanced technique combining pre-enrichment and passive filtration increases the isolation efficiency of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from water and animal fecal samples." Journal of microbiological methods.

Jones F, Orcutt M & Little RB (1931). "*Vibrios* (*Vibrio jejuni*, n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves." The Journal of experimental medicine **53**(6): 853-863.

Kabir SL, Kikuchi K, Asakura M, Shiramaru S, Tsuruoka N, Goto A, Hinenoya A & Yamasaki S (2011). "Evaluation of a Cytolethal Distending Toxin(*cdt*) Gene-Based Species-Specific Multiplex PCR Assay for the Identification of *Campylobacter* Strains Isolated from Diarrheal Patients in Japan." Japanese Journal of Infectious Diseases **64**(1): 19-27.

Karmali MA, Simor A, Roscoe M, Fleming P, Smith S & Lane J (1986). "Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces." Journal of clinical microbiology **23**(3): 456-459.

King EO (1957). "Human infections with *Vibrio fetus* and a closely related *vibrio*." Journal of Infectious Diseases **101**(2): 119-128.

Koenraad P, Rombouts F & Notermans S (1997). "Epidemiological aspects of thermophilic *Campylobacter* in water-related environments: a review." Water Environment Research **69**(1): 52-63.

Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B & Mickelson J (2004). "Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus." Journal of bacteriology **186**(11): 3296-3303.

Konkel ME, Kim BJ, Rivera□Amill V & Garvis SG (1999). "Bacterial secreted proteins are required for the internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells." Molecular microbiology **32**(4): 691-701.

Konkel ME, Kim BJ, Klena JD, Young CR & Ziprin R (1998). "Characterization of the Thermal Stress Response of *Campylobacter jejuni*." Infection and immunity **66**(8): 3666-3672.

Konkel ME & Joens LA (1989). "Adhesion to and invasion of HEp-2 cells by *Campylobacter* spp." Infection and immunity **57**(10): 2984-2990.

Kramer JM, Frost JA, Bolton FJ & Wareing DR (2000). "*Campylobacter* contamination of raw meat and poultry at retail sale: identification of multiple types and comparison with isolates from human infection." Journal of Food Protection® **63**(12): 1654-1659.

Kreader CA (1996). "Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein." Applied and environmental microbiology **62**(3): 1102-1106.

Krutkiewicz A & Klimuszko D (2010). "Genotyping and PCR detection of potential virulence genes in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from different sources in Poland." Folia microbiologica **55**(2): 167-175.

Lara-Tejero Ma & Galán JE (2001). "CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity." Infection and immunity **69**(7): 4358-4365.

Larson CL, Christensen JE, Pacheco SA, Minnich SA, Konkel M, Nachamkin I, Szymanski C & Blaser M (2008). "*Campylobacter jejuni* secretes proteins via the flagellar type III secretion system that contribute to host cell invasion and gastroenteritis." *Campylobacter*(Ed. 3): 315-332.

Lastovica A, Allos B, Nachamkin I, Szymanski C & Blaser M (2008). "Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacteri jejuni* and *Campylobacter coli*." *Campylobacter*(Ed. 3): 123-149.

Lévesque S, St-Pierre K, Frost E, Arbeit RD & Michaud S (2011). "Determination of the optimal culture conditions for detecting thermophilic campylobacters in environmental water." Journal of microbiological methods **86**(1): 82-88.

Levy A (1946). "A gastro-enteritis outbreak probably due to a bovine strain of *vibrio*." The Yale Journal of Biology and Medicine **18**(4): 243.

Lin J, Yan M, Sahin O, Pereira S, Chang Y-J & Zhang Q (2007). "Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens." Antimicrobial agents and chemotherapy **51**(5): 1678-1686.

Line JE (2001). "Development of a selective differential agar for isolation and enumeration of *Campylobacter* spp." Journal of Food Protection **64**(11): 1711-1715.

Linton D, Lawson A, Owen R & Stanley J (1997). "PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples." Journal of clinical microbiology **35**(10): 2568-2572.

Linton D, Owen R & Stanley J (1996). "Rapid identification by PCR of the genus *Campylobacter* and of five *Campylobacter* species enteropathogenic for man and animals." Research in microbiology **147**(9): 707-718.

Liu J, Gratz J, Maro A, Kumburu H, Kibiki G, Taniuchi M, Howlader AM, Sobuz SU, Haque R & Talukder KA (2012). "Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay." Journal of clinical microbiology **50**(1): 98-103.

Lu J, Ryu H, Vogel J, Santo Domingo J & Ashbolt NJ (2013). "Molecular Detection of *Campylobacter* spp. and Fecal Indicator Bacteria during the Northern Migration of Sandhill Cranes (*Grus canadensis*) at the Central Platte River." Applied and environmental microbiology **79**(12): 3762-3769.

Luangtongkum T, Shen Z, Seng VW, Sahin O, Jeon B, Liu P & Zhang Q (2012). "Impaired fitness and transmission of macrolide-resistant *Campylobacter jejuni* in its natural host." Antimicrobial agents and chemotherapy **56**(3): 1300-1308.

Lund M, Nordentoft S, Pedersen K & Madsen M (2004). "Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR." Journal of clinical microbiology **42**(11): 5125-5132.

Luo N, Pereira S, Sahin O, Lin J, Huang S, Michel L & Zhang Q (2005). "Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(3): 541-546.

Luo N, Sahin O, Lin J, Michel LO & Zhang Q (2003). "In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the function of the CmeABC efflux pump." Antimicrobial agents and chemotherapy **47**(1): 390-394.

Maher M, Finnegan C, Collins E, Ward B, Carroll C & Cormican M (2003). "Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces." Journal of clinical microbiology **41**(7): 2980-2986.

Malik-Kale P, Raphael BH, Parker CT, Joens LA, Klena JD, Quiñones B, Keech AM & Konkel ME (2007). "Characterization of genetically matched isolates of *Campylobacter jejuni* reveals that mutations in genes involved in flagellar biosynthesis alter the organism's virulence potential." Applied and environmental microbiology **73**(10): 3123-3136.

Mayr A, Lick S, Bauer J, Thärigen D, Busch U & Huber I (2010). "Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real-time PCR." Journal of Food Protection **73**(2): 241-250.

McFadyean J & Stockman S (1913). "Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Part III. Abortion in sheep. " London: HMSO.

McNulty CA (1987). "The treatment of *Campylobacter* infections in man." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **19**(3): 281-284.

Miller WG (2008). "Comparative Genomics of *Campylobacter* Species Other Than *Campylobacter jejuni*." *Campylobacter*(Ed. 3): 73-98.

Miller WG & Mandrell RE (2005). "Prevalence of *Campylobacter* in the food and water supply: incidence, outbreaks, isolation and detection." *Campylobacter*: Molecular and cellular biology: 101-163.

Millson M, Bokhout M, Carlson J, Spielberg L, Aldis R, Borczyk A & Lior H (1991). "An outbreak of *Campylobacter jejuni* gastroenteritis linked to meltwater contamination of a municipal well." Canadian journal of public health. Revue canadienne de santé publique **82**(1): 27.

Minvielle B, Magras C, Laroche M, Desmonts M & Mircovich C (2007). *Campylobacter* in the pork food chain: a quantitative hazard analysis. 7th International Symposium on the epidemiology and control of foodborne pathogens in pork (Safepork).

Monteville MR, Yoon JE & Konkel ME (2003). "Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization." Microbiology **149**(1): 153-165.

Moore J, Caldwell P, Millar B & Murphy P (2001). "Occurrence of *Campylobacter* spp. in water in Northern Ireland: implications for public health." The Ulster medical journal **70**(2): 102-107.

Moore J (2000). "Comparison of basal broth media for the optimal laboratory recovery of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*." Irish journal of medical science **169**(3): 187-189.

Morey F (1996). Five years of *Campylobacter* bacteraemia in Central Australia. Campylobacters, helicobacters, and related organisms, Springer: 491-494.

Mullner P, Shadbolt T, Collins-Emerson J, Midwinter A, Spencer SE, Marshall J, Carter P, Campbell D, Wilson D & Hathaway S (2010). "Molecular and spatial epidemiology of human campylobacteriosis: source association and genotype-related risk factors." Epidemiology and infection **138**(10): 1372.

National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (1994). "*Campylobacter* jejuni/coli." Journal of Food Protection **57**(12): 1101-1121.

Newell DG, McBride H & Dolby JM (1985). "Investigations on the role of flagella in the colonization of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines." Epidemiology and infection **95**(2): 217-227.

Nyati KK & Nyati R (2013). "Role of *Campylobacter jejuni* infection in the pathogenesis of Guillain Barré syndrome: an update" BioMed Research International 2013:852195. doi: 10.1155/2013/852195.

Nielsen EM, Fussing V, Engberg J, Nielsen NL & Neimann J (2006). "Most *Campylobacter* subtypes from sporadic infections can be found in retail poultry products and food animals." Epidemiology and infection **134**(4): 758-767.

Nielsen HL, Engberg J, Ejlertsen T & Nielsen H (2014). "Psychometric scores and persistence of irritable bowel after *Campylobacter concisus* infection." Scandinavian Journal of Gastroenterology **49**(5):545-51.

Nirdnoy W, Mason CJ & Guerry P (2005). "Mosaic structure of a multiple-drug-resistant, conjugative plasmid from *Campylobacter jejuni*." Antimicrobial agents and chemotherapy **49**(6): 2454-2459.

Olson CK, Ethelberg S, Pelt Wv, Tauxe RV, Nachamkin I, Szymanski C & Blaser M (2008). "Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations." *Campylobacter*(Ed. 3): 163-189.

On S, McCarthy N, Miller W, Gilpin B, Nachamkin I, Szymanski C & Blaser M (2008). "Molecular epidemiology of *Campylobacter* species." *Campylobacter*(Ed. 3): 191-211.

Pei Z, Burucoa C, Grignon B, Baqar S, Huang X-Z, Kopecko DJ, Bourgeois A, Fauchere J-L & Blaser MJ (1998). "Mutation in the peb1A locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice." Infection and immunity **66**(3): 938-943.

Pezzotti G, Serafin A, Luzzi I, Mioni R, Milan M & Perin R (2003). "Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy." International journal of food microbiology **82**(3): 281-287.

Piddock LJ (1995). "Quinolone resistance and *Campylobacter* spp." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **36**(6): 891-898.

Pires SM, Vigre H, Makela P & Hald T (2010). "Using outbreak data for source attribution of human salmonellosis and campylobacteriosis in Europe." Foodborne Pathogens and Disease **7**(11): 1351-1361.

Pitkänen T, Bräcker J, Miettinen IT, Heitto A, Pesola J & Hakalehto E (2009). "Enhanced enrichment and detection of thermotolerant *Campylobacter* species from water using the Portable Microbe Enrichment Unit and real-time PCR." Canadian journal of microbiology **55**(7): 849-858.

Pratt A & Korolik V (2005). "Tetracycline resistance of Australian *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **55**(4): 452-460.

Price LB, Lackey LG, Vailes R & Silbergeld E (2007). "The persistence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in poultry production." Environmental health perspectives **115**(7): 1035.

Price LB, Johnson E, Vailes R & Silbergeld E (2005). "Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* isolates from conventional and antibiotic-free chicken products." Environmental health perspectives **113**(5): 557.

Rautelin H, Renkonen O-V & Kosunen TU (1991). "Emergence of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in subjects from Finland." Antimicrobial agents and chemotherapy **35**(10): 2065-2069.

Reeser RJ, Medler RT, Billington SJ, Jost BH & Joens LA (2007). "Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions." Applied and environmental microbiology **73**(6): 1908-1913.

Reina J, Borrell N & Serra A (1992). "Emergence of resistance to erythromycin and fluoroquinolones in thermotolerant *Campylobacter* strains isolated from feces 1987–1991." European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases **11**(12): 1163-1166.

Ribeiro C & Price T (1984). "The use of Preston enrichment broth for the isolation of" thermophilic" campylobacters from water." Journal of Hygiene **92**: 45-51.

Rinsoz T, Hilfiker S & Oppliger A (2009). "Quantification of thermotolerant *Campylobacter* in Swiss water treatment plants, by real-time quantitative polymerase chain reaction." Water Environment Research **81**(9): 929-933.

Robinson DA (1981). "infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk" British Medical Journal (Clinical Research Ed.) 282:1584.

Rosef O, Kapperud G & Skjerve E (1987). "Comparison of media and filtration procedures for qualitative recovery of thermotolerant *Campylobacter* spp. from naturally contaminated surface water." International journal of food microbiology **5**(1): 29-39.

Sebald M & Véron M (1963). Base DNA content and classification of *Vibrios*. Annales de l'Institut Pasteur.

Sheppard SK, Colles FM, McCARTHY ND, Strachan NJ, Ogden ID, Forbes KJ, Dallas JF & Maiden MC (2011). "Niche segregation and genetic structure of *Campylobacter jejuni* populations from wild and agricultural host species." Molecular ecology **20**(16): 3484-3490.

Sheppard SK, Dallas JF, Strachan NJ, MacRae M, McCarthy ND, Wilson DJ, Gormley FJ, Falush D, Ogden ID & Maiden MC (2009). "*Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection." Clinical Infectious Diseases **48**(8): 1072-1078.

Skirrow M & Blaser M (1995). "*Campylobacter jejuni*." Infections of the gastrointestinal tract **2**: 719.

Slater E & Owen R (1997). "Restriction fragment length polymorphism analysis shows that the hippuricase gene of *Campylobacter jejuni* is highly conserved." Letters in applied microbiology **25**(4): 274-278.

Smith T & Taylor MS (1919). "Some morphological and biological characters of the spirilla (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle." The Journal of experimental medicine **30**(4): 299-311.

Steele M, Marcone M, Gyles C, Chan V & Odumeru J (2006). "Enzymatic activity of *Campylobacter jejuni* hippurate hydrolase." Protein Engineering Design and Selection **19**(1): 17-25.

Steele M, McNab B, Fruhner L, DeGrandis S, Woodward D & Odumeru J (1998). "Epidemiological typing of *Campylobacter* isolates from meat processing plants by pulsed-field gel electrophoresis, fatty acid profile typing, serotyping, and biotyping." Applied and environmental microbiology **64**(7): 2346-2349.

Stelzer W, Mochmann H, Richter U & Dobberkau H-J (1988). "Characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from waste water." Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology **269**(2): 188-196.

Stern N, Nachamkin I, Blaser M & Tompkins L (1992). "Reservoirs for *Campylobacter jejuni* and approaches for intervention in poultry." American Society for Microbiology, Washington, DC (USA). 1992.

Strachan NJ, Gormley FJ, Rotariu O, Ogden ID, Miller G, Dunn GM, Sheppard SK, Dallas JF, Reid TM & Howie H (2009). "Attribution of *Campylobacter* infections in northeast Scotland to specific sources by use of multilocus sequence typing." Journal of Infectious Diseases **199**(8): 1205-1208.

Sunohara M, Topp E, Wilkes G, Gottschall N, Neumann N, Ruecker N, Jones T, Edge T & Marti R (2012). "Impact of Riparian Zone Protection from Cattle on Nutrient, Bacteria, F-coliphage, and Loading of an Intermittent Stream." Journal of Environmental Quality **41**(4): 1301-1314.

Talukder KA, Aslam M, Islam Z, Azmi IJ, Dutta DK, Hossain S, Nur-E-Kamal A, Nair GB, Cravioto A & Sack DA (2008). "Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh." Journal of clinical microbiology **46**(4): 1485-1488.

Tannæs T, Dekker N, Bukholm G, Bijlsma JJ & Appelmelk BJ (2001). "Phase variation in the *Helicobacter pylori* phospholipase A gene and its role in acid adaptation." Infection and immunity **69**(12): 7334-7340.

Thibodeau A, Fravalo P, Laurent-Lewandowski S, Guévremont E, Quessy S & Letellier A (2011). "Presence and characterization of *Campylobacter jejuni* in organically raised chickens in Quebec." Canadian Journal of Veterinary Research **75**(4): 298.

Thomas MK, Majowicz SE, Sockett PN, Fazil A, Pollari F, Doré K, Flint JA & Edge VL (2006). "Estimated numbers of community cases of illness due to *Salmonella*, *Campylobacter* and verotoxigenic *Escherichia coli*: Pathogen-specific community rates." The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology **17**(4): 229.

Tracz DM, Keelan M, Ahmed-Bentley J, Gibreel A, Kowalewska-Grochowska K & Taylor DE (2005). "*pVir* and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis." Emerging infectious diseases **11**(6): 839.

Trieber CA & Taylor DE (2000). "Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter*." *Campylobacter*: 441-454.

Ugarte□Ruiz M, Gómez□Barrero S, Porrero M, Alvarez J, García M, Comerón M, Wassenaar T & Domínguez L (2012). "Evaluation of four protocols for the detection and isolation of thermophilic *Campylobacter* from different matrices." Journal of applied microbiology **113**(1): 200-208.

Van Dyke M, Morton V, McLellan N & Huck P (2010). "The occurrence of *Campylobacter* in river water and waterfowl within a watershed in southern Ontario, Canada." Journal of applied microbiology **109**(3): 1053-1066.

Vandamme P & De Ley J (1991). "Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*." International Journal of Systematic Bacteriology **41**(3): 451-455.

Varela NP, Friendship RM & Dewey CE (2007). "Prevalence of *Campylobacter* spp. isolated from grower-finisher pigs in Ontario." The Canadian Veterinary Journal **48**(5): 515.

Vinzent R, Dumas J & Picard N (1947). "Septicemie grave au cours de la grossesse due a un vibrion. Avortement consecutif." Bulletin de l'Académie Nationale de médecine **131**: 90-92.

Volokhov D, Chizhikov V, Chumakov K & Rasooly A (2003). "Microarray-based identification of thermophilic *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*." Journal of clinical microbiology **41**(9): 4071-4080.

Wassenaar TM, On SL & Meinersmann R (2000). "Genotyping and the consequences of genetic instability." *Campylobacter* **2**: 369-380.

Wassenaar TM, Bleumink-Pluym N & Van der Zeijst B (1991). "Inactivation of *Campylobacter jejuni* flagellin genes by homologous recombination demonstrates that *flaA* but not *flaB* is required for invasion." The EMBO journal **10**(8): 2055.

Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM & Pickett CL (1998). "*Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block." Infection and immunity **66**(5): 1934-1940.

Wilkes G, Edge T, Gannon V, Jokinen C, Lyautey E, Neumann N, Ruecker N, Scott A, Sunohara M & Topp E (2011). "Associations among pathogenic bacteria, parasites, and environmental and land use factors in multiple mixed-use watersheds." Water Research **45**(18): 5807-5825.

Wilkes G, Edge T, Gannon V, Jokinen C, Lyautey E, Medeiros D, Neumann N, Ruecker N, Topp E & Lapen DR (2009). "Seasonal relationships among indicator bacteria, pathogenic bacteria, *Cryptosporidium oocysts*, *Giardia cysts*, and hydrological indices for surface waters within an agricultural landscape." Water Research **43**(8): 2209-2223.

Willey J (2008). Prescott, Harley, and Klein's Microbiology-7th international ed./Joanne M. Willey, Linda M. Sherwood, Christopher J. Woolverton, New York [etc.]: McGraw-Hill Higher Education.

Wiström J & Norrby SR (1995). "Fluoroquinolones and bacterial enteritis, when and for whom?" Journal of Antimicrobial Chemotherapy **36**(1): 23-39.

Zhang Q, Plummer PJ, Nachamkin I, Szymanski C & Blaser M (2008). "Mechanisms of antibiotic resistance in *Campylobacter*." *Campylobacter*(Ed. 3): 263-276.

Zhang Q, Lin J & Pereira S (2003). "Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in animal reservoirs: dynamics of development, resistance mechanisms and ecological fitness." Animal Health Research Reviews **4**: 63-72.

Zheng J, Meng J, Zhao S, Singh R & Song W (2006). "Adherence to and invasion of human intestinal epithelial cells by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from retail meat products." Journal of Food Protection **69**(4): 768-774.